



# Etude du maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress chronique du RE

Yohan Demay

## ► To cite this version:

Yohan Demay. Etude du maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress chronique du RE. Biologie cellulaire. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. NNT : 2014VERS0024 . tel-01138114

**HAL Id: tel-01138114**

**<https://theses.hal.science/tel-01138114>**

Submitted on 1 Apr 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE VERSAILLES ST-QUENTIN-EN-YVELINES

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE VERSAILLES ST-QUENTIN-EN-YVELINES**

Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue

Par

**Yohan DEMAY**

Le 22 Janvier 2014

**Etude du maintien de l'homéostasie tissulaire après induction  
d'un stress chronique du RE.**

Directeurs de thèse : Didier CONTAMINE, Bernard MIGNOTTE

Co-Directeur de thèse : Sébastien GAUMER

Jury :

Mme Frédérique PERONNET	Chargée de recherche, CNRS	Rapporteur
M Julien COLOMBANI	Chargé de recherche, CNRS	Rapporteur
M Dominique FERRANDON	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
M Sébastien GAUMER	Maître de Conférences, UVSQ	Examineur
Mme Anne-Marie PRET	Professeur, UVSQ	Président
M Bernard MIGNOTTE	Professeur, UVSQ	Directeur de thèse

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire  
Bâtiment Simone Veil -2 avenue de la Source de la Bièvre  
78180 Montigny-le-Bretonneux

## **Remerciements**

Je souhaite en premier lieu rendre hommage à Didier Contamine qui est à l'origine de ce travail et qui n'a malheureusement pas pu voir son aboutissement. J'aurais aimé pouvoir le remercier de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir encadré durant toutes une partie de ma thèse, de m'avoir raconté un certain nombre d'histoires toutes plus intéressantes les unes que les autres, de m'avoir fait part de ses théories qui étaient parfois, il est vrai, un peu tarabiscotées mais qui m'ont donné envie de travailler avec lui. J'aurais également aimé pouvoir le remercier pour sa disponibilité et sa gentillesse qui rendaient les journées au laboratoire très agréables. En bref, ce fut un vrai plaisir de travailler avec lui. J'aimerais également rendre hommage à Evelyne Maillet, qui vient également de nous quitter. Son caractère bien trempé et son grand cœur me manqueront.

J'aimerais également remercier mon co-directeur de thèse, Sébastien Gaumer, pour avoir pris le relais. Bien que fortement occupé par ses fonctions d'enseignant, il a toujours été disponible quand j'en avais besoin. Je ne sais pas si je dois le remercier pour son humour car j'ai peur que cela l'encourage à faire encore plus de blagues ou de jeux de mots. Je n'oublie pas son aide précieuse dans la relecture et la correction de ce manuscrit, auquel j'aimerais associer Sébastien Szuplewski qui y a également largement contribué. J'en profite pour remercier également Jessica qui m'a rendu un certain nombre de services durant la fin de ma thèse. J'espère que tu feras de belles manips qui te donneront de beaux résultats. Dans le cas où il y aurait besoin de faire deux ou trois dissections, quelques comptages, n'hésite pas à m'appeler, on pourra toujours s'arranger.

Je remercie tous les membres du LGBC, pour leur gentillesse, leur générosité qui rend l'ambiance de ce laboratoire si agréable et qui m'ont permis d'aller « au bout de la race » (Adrienne Baillet *et al.*, 2012). Les conversations du midi vont me manquer. Je n'entendrai potentiellement plus parler de « The human centipede » qui était, je pense, le sujet qui revenait le plus souvent. Je crois que tout le bâtiment en connaît l'histoire. Merci Caro. J'en profite également pour la remercier pour les codes Free qui m'ont permis de rédiger en grande partie cette thèse grâce à la box internet de mes voisins.

Je remercie également l'ensemble des personnes qui travaillent en pièce à mouches pour toutes les discussions que nous avons pu avoir mais également pour m'avoir fait découvrir un certain nombre de CD plus passionnants les uns que les autres. Je pense tout particulièrement

à la version Zouk de « Aicha » qui est une petite merveille. J'en profite pour remercier Marcelle d'avoir bichonné mes petits stocks. Je pense que j'aurais perdu bien plus de mouches si tu n'avais pas été là. Tes accras, ton féroce et ti punch bien que trop rares vont également me manquer. Mais sache que ce n'est pas une commande, ne te sens surtout pas forcée d'en faire pour mon pot de thèse. Quoi que...

J'aimerais remercier mes parents et mes frères de m'avoir toujours soutenu et encouragé à faire ce qui me plaisait. Je voudrais remercier mon père qui pense que je fais actuellement de la recherche car il m'a inscrit au foot quand j'étais petit. Pour le coup, je n'ai toujours pas saisi le lien mais bon...

Bien sûr, je remercie mes mouches d'avoir bien copulé et donné de nombreux descendants durant ces longues années. Je m'excuse d'avoir, un petit peu malmené vos progénitures mais j'y ai pris beaucoup de plaisir. Si c'était à refaire, je le referais.

Pour finir j'aimerais remercier Julie qui m'a soutenu pendant ces longues années, durant les périodes de doutes, les périodes de stress, d'avoir accepté que j'aille au labo un ou deux week-ends par ci par là. Et, bien sûr, je te remercie d'avoir participé à la relecture de mon manuscrit. Je t'aime comme un fou, comme un soldat, comme une star de cinéma. Tu vois, je t'aime comme ça (Larra Fabian *et al.* , 1998).



# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>9</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>14</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>1. La mort cellulaire</b>	<b>19</b>
1.1. L'apoptose	19
1.1.1. Les différents types d'apoptose	19
1.1.1.1. L'apoptose développementale	19
1.1.1.2. L'apoptose accidentelle	21
1.1.2. Les caspases	21
1.2. La voie mitochondriale de l'apoptose	22
1.2.1. La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères	22
1.2.1.1. Les membres de la famille Bcl-2	24
1.2.1.2. Activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	24
1.2.1.3. Conséquences de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale	25
1.2.2. La voie intrinsèque chez la drosophile	25
1.2.2.1. Les membres de la famille Bcl-2	25
1.2.2.2. Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et relargage du cytochrome C	27
1.2.2.3. Fragmentation de la mitochondrie	28
1.2.2.4. Les principaux acteurs	28
1.2.2.4.1. DIAP1	29
1.2.2.4.2. Les antagonistes des IAP : les protéines RHG	31
1.3. La voie extrinsèque de l'apoptose	32
1.3.1. La voie extrinsèque chez les mammifères	32
1.3.1.1. Le groupe 1	33
1.3.1.2. Le groupe 2	33
1.3.2. La voie extrinsèque chez la drosophile : la voie Eiger/Wengen	35
1.3.3. Apoptose régulée par la voie JNK chez la drosophile	36
1.3.3.1. La voie JNK	36
1.3.3.2. Activation de la voie JNK dans les mécanismes d'apoptose	37
<b>2. Réticulum endoplasmique et stress</b>	<b>41</b>
2.1. Le réticulum endoplasmique	41
2.1.1. La synthèse lipidique	41
2.1.2. L'homéostasie calcique	41
2.1.2.1. Les protéines tampons	43
2.1.2.2. Les canaux calciques	43
2.1.2.2.1. SERCA	43
2.1.2.2.2. IP3R	44
2.1.2.2.3. RyR	44
2.1.2.3. La préséniline	45
2.1.2.3.1. La $\gamma$ -sécrétase	47
2.1.2.3.2. Fonction indépendante de l'activité $\gamma$ -sécrétase	49
2.1.3. La synthèse protéique	50
2.1.3.1. Translocation/modifications post-traductionnelles	50
2.1.3.2. Le cycle calnexine/calreticuline	51
2.2. Stress du RE et pathologie	53

2.2.1.	L'UPR	54
2.2.1.1.	Les différentes branches de l'UPR	55
2.2.1.1.1.	La branche IRE1	55
2.2.1.1.2.	La branche PERK	57
2.2.1.1.3.	La branche ATF6	59
2.2.1.2.	Détection des protéines mal conformées par les différents senseurs	61
2.2.2.	Conséquences de l'UPR	63
2.2.2.1.	Adaptation au stress du RE	64
2.2.2.2.	Apoptose dépendante du stress du RE	66
2.2.2.2.1.	Apoptose dépendante de CHOP	66
2.2.2.2.2.	Apoptose dépendante de la voie IRE1/JNK	67
2.2.2.2.3.	Apoptose dépendante des calpaïnes	67
2.2.2.2.4.	Apoptose indépendante des trois branches	69
2.2.2.3.	Survie versus apoptose	69
<b>3.</b>	<b>Le contrôle de la prolifération cellulaire</b>	<b>71</b>
3.1.	Le cycle cellulaire chez la drosophile	71
3.2.	Régulation de la prolifération cellulaire/croissance du disque imaginal d'aile	71
3.2.1.	Les morphogènes	73
3.2.1.1.	Les voies de signalisation	75
3.2.1.1.1.	La voie Dpp	75
3.2.1.1.2.	La voie Wg	75
3.2.1.2.	Morphogènes et prolifération cellulaire	75
3.2.1.2.1.	Régulation de la prolifération par Dpp	75
3.2.1.2.2.	Régulation de la prolifération par Wg	76
3.2.2.	La voie Hippo	77
3.3.	Régulation de la croissance tissulaire au sein de l'organisme	81
3.3.1.	L'ecdysone	81
3.3.1.1.	Voie de l'insuline	82
3.3.1.2.	Voie PTTH/ERK	83
3.3.1.3.	La voie de l'activine	85
3.3.2.	Ecdysone et cycle cellulaire	85
<b>4.</b>	<b>Mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire</b>	<b>86</b>
4.1.	La réparation des blessures et la régénération	86
4.1.1.	Réparation des blessures	87
4.1.2.	Rôle de la voie JNK dans la réparation des blessures	89
4.1.3.	Régénération des disques imaginaires larvaires	91
4.2.	La prolifération compensatoire	93
4.2.1.	Les cellules mort-vivantes en présence de p35	94
4.2.2.	En absence de p35	96
4.3.	Arrêt de la prolifération dans les compartiments adjacents.	97
4.4.	Retard d'entrée en métamorphose	99
4.5.	L'apoptose compensatoire	105
<b>II.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>108</b>
<b>1.</b>	<b>Article 1</b>	<b>110</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats complémentaires</b>	<b>126</b>
2.1.	Induction de l'apoptose par un stress chronique du RE	126
2.1.1.	Induction d'un stress chronique du RE par la surexpression de la préséniline	126
2.1.2.	Lien entre le stress du RE et la voie de l'apoptose	133
2.1.2.1.	La branche ATF6 ne semble pas être impliquée dans l'induction de l'apoptose et l'activation de la voie JNK	133
2.1.2.2.	Activation de l'apoptose par la branche PERK/ATF4	136

2.1.2.3.	Implication de Ref(2)P dans la formation d'agrégats de Psn	138
2.1.3.	Implication des protéines RHG.	144
2.2.	Compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE chez la drosophile	148
2.2.1.	Stress du RE et prolifération compensatoire	148
2.2.2.	Rôle des voies p38, ERK et Hippo dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress du RE	158
2.2.3.	Coordination de la croissance d'un tissu et voie JNK	166
2.2.4.	Implication des mécanismes favorisant la réparation des blessures après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE.	170
2.2.5.	Induction du retard de l'entrée en métamorphose	172
2.2.5.1.	Lien entre la voie PERK/ATF4 et la voie JNK.	174
2.2.5.2.	La voie de l'acide rétinoïque	176
<b>III.</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>181</b>
1.	La surexpression de <i>Psn</i> a un effet indépendant de l'activité $\gamma$ -sécrétase.	183
2.	La branche PERK/ATF4 activée par la surexpression de <i>Psn</i> induit de l'apoptose.	184
3.	L'activation de la voie PERK/ATF4 n'entraîne pas de prolifération compensatoire.	187
4.	L'activation de la voie JNK permet la coordination de la croissance des compartiments du disque imaginal d'aile.	188
5.	La branche PERK/ATF4 active la voie JNK qui régule l'expression de <i>dilp8</i> .	190
6.	L'activation de la voie JNK permet le maintien de l'homéostasie tissulaire en induisant un délai de l'entrée en métamorphose.	191
<b>IV.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>193</b>
1.	Stocks et croisements	195
2.	Test d'interaction génétique.	196
3.	Immunohistochimie et microscopie.	199
4.	Marquage au BrdU.	200
5.	Marquage au X-GAL (visualisation de l'expression de <i>lacZ</i> ).	200
6.	Quantification de l'expression de <i>dilp8</i> et de la prolifération.	201
<b>V.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>203</b>

## Liste des abréviations

20E	<u>20</u> -hydroxy <u>e</u> cdysone
ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
A/P	<u>A</u> ntéro/ <u>P</u> ostérieur
ANOVA	<u>A</u> nalysis of <u>v</u> ariance
AP-1	<u>A</u> daptor protein complex- <u>1</u>
Apaf-1	<u>A</u> poptotic protease- <u>a</u> ctivating factor <u>1</u>
APH-1	<u>A</u> nterior pharynx defective- <u>1</u>
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique
ARNi	<u>ARN</u> <u>i</u> ntérférent
ARNm	<u>ARN</u> <u>m</u> essenger
ATF4	<u>A</u> ctivating transcription factor <u>4</u>
ATF6	<u>A</u> ctivating transcription factor <u>6</u>
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma <u>2</u>
Ben	<u>B</u> endless
BH	<u>B</u> cl-2 <u>h</u> omology
BiP	<u>B</u> inding of <u>i</u> mmunoglobulin protein
BIR	<u>B</u> aculovirus <u>i</u> nhibitory repeat
Bl	<u>B</u> ristle
BrdU	<u>B</u> romo <u>d</u> éoxy <u>U</u> ridine
brk	<u>b</u> rink <u>e</u> r
Bsk	<u>B</u> asket
b-ZIP	<u>b</u> asic-leucine <u>Z</u> ipper motif
CaMKII	<u>C</u> almodulin-dependent protein <u>k</u> inase <u>II</u>
Caspase	<u>C</u> ysteiny <u>l</u> <u>a</u> spartate cleaving protease
Cdc42	<u>C</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ycle <u>42</u>
CHOP	<u>C</u> CAAT-enhancer-binding protein <u>h</u> omologous protein
COPII	<u>C</u> oat protein complex <u>II</u>
CTF	<u>C</u> - <u>t</u> erminal <u>f</u> ragment
Cyc	<u>C</u> ycline
D/V	<u>D</u> orso/ <u>V</u> entral
Dark	<u>D</u> rosophila <u>A</u> paf-1-related <u>k</u> iller
DASK1	<u>D</u> rosophila apoptosis <u>s</u> ignal-regulating <u>k</u> inase <u>1</u>
Dcp-1	<u>D</u> eath <u>c</u> aspase- <u>1</u>
DD	<u>D</u> eath <u>d</u> omain
Decay	<u>D</u> eath <u>e</u> xecutioner <u>c</u> aspase related to <u>a</u> papain/ <u>Y</u> ama
DIAP	<u>D</u> rosophila <u>i</u> nhibitor of <u>a</u> poptosis protein
Dilp	<u>D</u> rosophila <u>i</u> nsulin- <u>l</u> ike peptide
Dpp	<u>D</u> ecapentaplegic
Dr	<u>D</u> rop

Drice	<u>Drosophila ICE</u>
Dronc	<u>Drosophila Nedd-2-like caspase</u>
Ds	<u>Dachsous</u>
DTraf	<u>Drosophila TNF receptor associated factor</u>
Duev1a	<u>Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme variant 1a</u>
EcR	<u>Ecdysone receptor</u>
EGFP	<u>Enhanced green fluorescent protein</u>
eIF2	<u>Eukaryotic translation initiation factor 2</u>
Eiger	<u>Eda-like cell death trigger</u>
ER	<u>Endoplasmic reticulum</u>
ERAD	<u>ER-associated degradation</u>
ERK	<u>Extracellular signal-related kinase</u>
ERO	<u>ER oxydase</u>
Fra	<u>Fos-related antigen</u>
GADD34	<u>Growth arrest and DNA damage-inducible gene 34</u>
GFP	<u>Green florescent protein</u>
Grp	<u>Glucose-regulated protein</u>
Hsc70-3	<u>Heat shock cognate protein of 70-kDa 3</u>
Hep	<u>Hemipterous</u>
Hh	<u>Hedgehog</u>
Hid	<u>Head involution defective</u>
HOW	<u>Held out wing</u>
Hpo	<u>Hippo</u>
IAP	<u>Inhibitor apoptosis protein</u>
IBM	<u>IAP-binding motif</u>
InR	<u>Insulin receptor</u>
IP3	<u>Inositol 1, 4, 5-triphosphate</u>
IP3R	<u>IP3 receptor</u>
IPC	<u>Insulin-producing cell</u>
IRE-1	<u>Inositol requiring enzyme-1</u>
JNK	<u>c-Jun N-terminal kinase</u>
Jra	<u>Jun-related antigen</u>
MAPK	<u>Mitogen-activated protein kinase</u>
MAP2K	<u>MAPK kinase</u>
MAP3K	<u>MAPK Kinase kinase</u>
MAP4K	<u>MAPK Kinase kinase kinase</u>
MCP	<u>Mort cellulaire programmée</u>
Mekk	<u>MAP/ERK kinase kinase 1</u>
Mkk4	<u>MAP kinase kinase 4</u>
MMP	<u>Métalloprotéase matricielle</u>
Msn	<u>Misshapen</u>
NTF	<u>N-terminal fragment</u>
PDI	<u>Protein disulfide isomerase</u>
PEN-2	<u>Presenilin enhancer-2</u>

PERK	<u>P</u> rotein kinase RNA (PKR)-like <u>E</u> R <u>k</u> inase
PI3K	<u>P</u> hospho <u>i</u> nositide- <u>3</u> - <u>k</u> inase
PS1	<u>P</u> rés <u>e</u> niline <u>1</u> de mammifère
PS2	<u>P</u> rés <u>e</u> niline <u>2</u> de mammifère
Psn	<u>P</u> rés <u>e</u> niline de drosophile
PTTH	<u>P</u> ro <u>t</u> horacicot <u>r</u> opic <u>h</u> ormone
Puc	<u>P</u> uck <u>e</u> red
RE	<u>R</u> éticulum <u>e</u> ndoplasmique
RHG	<u>R</u> eaper <u>H</u> id <u>G</u> rim
Rho1	<u>R</u> as <u>h</u> omologous <u>1</u>
Rpr	<u>R</u> eaper
RyR	<u>R</u> yanodine <u>r</u> eceptor
S2	<u>S</u> chneider <u>2</u>
Sav	<u>S</u> alv <u>a</u> dor
Sd	<u>S</u> calloped
SERCA	<u>S</u> arco/endoplasmic <u>r</u> eticulum <u>C</u> a <sup>2+</sup> - <u>A</u> TPase
Slpr	<u>S</u> lipper
Strica	<u>S</u> er/ <u>T</u> hr- <u>r</u> ich <u>c</u> aspase
TAK1	<u>T</u> GF- $\beta$ - <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase <u>1</u>
TGF	<u>T</u> ransforming growth <u>f</u> actor
TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor
TNFR	<u>T</u> NF <u>r</u> eceptor
TRAF	<u>T</u> NFR- <u>a</u> ssociated <u>f</u> actor
TUNEL	<u>T</u> erminal deoxynucleotidyltransferase-mediated d <u>U</u> TP-biotin <u>N</u> ick <u>E</u> nd <u>L</u> abeling
UAS	<u>U</u> pstream <u>a</u> ctivating <u>s</u> equence
UPR	<u>U</u> nfolded protein <u>r</u> esponse
UTR	<u>U</u> ntranslated <u>r</u> egion
Vg	<u>V</u> estigial
Wg	<u>W</u> ingless
Wts	<u>W</u> arts
XBP1	<u>X</u> -box- <u>b</u> inding protein <u>1</u>
Yki	<u>Y</u> orkie
ZNC	<u>Z</u> one de <u>n</u> on-prolifération <u>c</u> ellulaire

## **Table des figures**

### *Introduction*

Figure 1 : Apoptose <i>versus</i> nécrose.....	19
Figure 2 : Les caspases de drosophile.....	22
Figure 3 : Comparaison entre les voies intrinsèques d'apoptose chez les mammifères et la drosophile.....	25
Figure 4 : Rôle central de DIAP1 dans la régulation de l'apoptose chez la drosophile.....	29
Figure 5 : Comparaison entre la voie extrinsèque de mammifère et la voie extrinsèque de drosophile.....	33
Figure 6 : La voie JNK.....	37
Figure 7 : Activation et rôle de la voie JNK durant l'apoptose chez la drosophile.....	39
Figure 8 : Structure et fonction du Réticulum endoplasmique.....	41
Figure 9 : Structure de la préséniline 1 de mammifère.....	45
Figure 10 : Fonction du complexe $\gamma$ -sécrétase.....	47
Figure 11 : Le cycle Calnéxine/ Calréticuline.....	51
Figure 12 : La voie IRE1 de l'UPR.....	55
Figure 13 : La voie PERK de l'UPR.....	57
Figure 14 : Inhibition de la synthèse protéique globale par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .....	59
Figure 15 : Régulation traductionnelle de l'ARNm codant ATF4.....	59
Figure 16 : La voie ATF6 de l'UPR.....	61
Figure 17 : Modèle d'activation de la détection du stress du RE par IRE1 chez la levure....	61
Figure 18 : Rôle protecteur de l'UPR.....	64
Figure 19 : Induction de l'apoptose après un stress chronique du RE.....	67
Figure 20 : Régulation du cycle cellulaire chez la drosophile.....	71
Figure 21 : Le morphogène Dpp induit une prolifération homogène au sein du disque en inhibant l'expression de <i>brk</i> .....	73
Figure 22 : La voie Hippo chez la drosophile.....	77
Figure 23 : La glande en anneau.....	79
Figure 24 : Profil de sécrétion de l'ecdysone au cours du développement de la drosophile..	79
Figure 25 : Régulation de la synthèse de l'ecdysone dans la glande prothoracique.....	83
Figure 26 : Réparation des blessures.....	87

Figure 27 : Implication de la voie JNK dans la réparation des blessures et la fermeture dorsale de l'embryon.....	89
Figure 28 : Différence de la réponse à l'induction d'une apoptose massive dans le disque imaginal d'aile en fonction de l'expression de <i>p35</i> dans un compartiment.....	94
Figure 29 : Induction de la prolifération compensatoire en absence d'expression de <i>p35</i> ....	97
Figure 30 : Maintien de l'homéostasie tissulaire par un arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent au compartiment endommagé.....	99
Figure 31 : Le retard de développement favorise le maintien de l'homéostasie tissulaire.....	101
Figure 32 : Régulation de la progression du développement après l'induction d'un défaut de croissance des disques imaginaux.....	103

## Résultats

Figure 33 : La force des phénotypes d'échancrures chez les adultes est corrélée à la quantité d'apoptose présente au niveau des disques imaginaux.....	126
Figure 34 : La perte de fonction de la voie Notch ne reproduit pas les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline.....	128
Figure 35 : Les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline ne semblent pas dépendre d'un gain de fonction de la $\gamma$ -sécrétase.....	130
Figure 36 : Le stress du RE dépend de la quantité de Préséniline.....	131
Figure 37 : Le stress du RE induit par la surexpression de la Préséniline n'est pas spécifique du tissu.....	132
Figure 38 : La voie ATF6 de l'UPR ne serait pas impliquée dans l'induction de l'apoptose et de la voie JNK.....	134
Figure 39 : La voie mitochondriale de l'apoptose ne semble pas être impliquée dans l'apoptose et l'activation de la voie JNK en réponse à un stress du RE.....	136
Figure 40 : La surexpression de <i>Psn</i> provoque son agrégation.....	138
Figure 41 : La voie PERK/ATF4 de l'UPR régule l'agrégation de <i>Psn</i> .....	140
Figure 42 : Ref(2)P ne module pas l'agrégation protéique médiée par la branche PERK/ATF4 de la réponse UPR.....	142



Figure 43 : La déplétion de DIAP1 est suffisante pour induire de l'apoptose.....	144
Figure 44 : L'induction d'un stress du RE induit une expression dépendante de la voie JNK des gènes <i>rpr</i> et <i>hid</i> .....	144
Figure 45 : Les protéines RHG ne sont pas impliquées dans l'apoptose dépendante de la surexpression de <i>Psn</i> .....	146
Figure 46 : La voie JNK n'est pas impliquée dans l'induction de l'apoptose.....	148
Figure 47 : L'inhibition transcriptionnelle de <i>diap1</i> médiée par ATF4 pourrait être totale....	148
Figure 48 : Modèle d'induction de l'apoptose par la branche PERK/ATF4 de la réponse UPR.....	148
Figure 49 : L'apoptose induite par le stress du RE induit une augmentation de l'expression de <i>pcna</i> dans les cellules situées en position apicale par rapport aux cellules apoptotiques au niveau de la frontière D/V.....	150
Figure 50 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine <i>vg</i> augmente le nombre de cellules en réplication au niveau de la ZNC.....	150
Figure 51 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine <i>vg</i> diminue le nombre de cellules en mitose au niveau de la ZNC.....	151
Figure 52 : La mort induite par un stress du RE dans le domaine d'expression de <i>vg</i> , <i>bx</i> et <i>nub</i> n'induit pas de prolifération compensatoire.....	153
Figure 53 : Les cellules apoptotiques n'expriment pas de mitogènes mais provoquent une modulation de leur domaine d'expression endogène qui pourrait expliquer l'augmentation de la réplication au niveau de la région correspondant à la ZNC.....	156
Figure 54 : Dpp ne serait pas impliquée dans l'induction de la réplication au niveau de la ZNC.....	156
Figure 55 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine <i>vg</i> induit une augmentation de la réplication indépendante de la voie JNK au niveau de la ZNC.....	158
Figure 56 : Yki ne semble pas être activée par l'apoptose dépendante d'un stress du RE.....	162
Figure 57 : Scalloped n'est pas impliqué dans la modification de la réplication induite par le stress du RE au niveau de la ZNC.....	164

Figure 58 : La mort induite par un stress du RE dans le compartiment postérieur n'induit pas de prolifération compensatoire mais un arrêt de la prolifération dans le compartiment antérieur qui pourrait dépendre de la voie JNK.....166

Figure 59: La voie JNK pourrait réguler l'équilibre entre le compartiment antérieur et postérieur.....168

Figure 60 : Le stress du RE induit des mécanismes ressemblant à ceux impliqués dans la réparation des blessures.....170

Figure 61 : Vérification de l'efficacité de l'ARNi dirigé contre MMP1.....172

Figure 62 : Msn appartient à une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie JNK.....174

Figure 63 : Ced-12 régule l'expression de *dilp8*.....176

Figure 64 : Ced-12 ne module pas l'apoptose.....176

Tableau 1: L'apoptose induite par un stress du RE dépendant de la surexpression de *Psn* ne semble pas contrôlée par la voie Pdi-IP3R-CaMKII.....138

Tableau 2 : La déplétion de Ref(2)P ne modifie pas pas les phénotypes d'échancrures.....142

Tableau 3 : La déplétion des protéines RHG ne diminue pas les phénotypes d'échancrures.146

Tableau 4 : Dpp est impliqué dans le processus de maintien de l'homéostasie tissulaire.....158

Tableau 5 : La voie ERK ne semble pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.....160

Tableau 6 : La voie p38 n'est pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.....160

Tableau 7 : La voie Fat-Hippo ne serait pas impliquée dans l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress du RE.....164

Tableau 8 : Les gènes principaux impliqués dans la réparation des blessures ne semblent pas impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.....172

Tableau 9 : La GEF ced-12 pourrait être impliquée dans l'induction de *dilp8*.....176

Tableau 10 : La voie de l'acide rétinoïque ne semble pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE.....178

## Matériels et Méthodes

Figure 65 : Protocole des tests d'interaction génétique.....	196
--------------------------------------------------------------	-----

## **Avant-propos**

Des changements physiologiques tels que la perturbation de l'homéostasie calcique, une expression trop élevée de protéines empruntant la voie de sécrétion, une déplétion en glucose, une hypoxie peuvent aboutir à une accumulation de protéines non ou mal-conformées [1] qui interfèrent avec le fonctionnement normal du RE aboutissant à un stress du RE.

En réponse à ce stress, l'Unfolded Protein Response (UPR) est activée. Dans le cas où celui-ci perdure, l'UPR déclenche un certain nombre de voies pro-apoptotiques *via* l'intermédiaire des trois principaux senseurs de ce stress présents à la membrane du RE que sont PERK, IRE1 et ATF6 chez les mammifères. Les mécanismes permettant à l'UPR d'induire l'apoptose restent encore mals connus. Cette méconnaissance est encore plus flagrante chez la drosophile, où l'étude de l'UPR n'a débuté que récemment, même si les senseurs de l'UPR sont conservés. Cette apoptose peut aboutir à un déséquilibre de la balance homéostatique et favoriser l'apparition de pathologies telles que l'athérosclérose, l'obésité, un certain nombre de cancers, des maladies auto-immunes, [2-5] ou neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington [6, 7].

En réponse à un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire causé par un excédent d'apoptose, différents mécanismes conservés au cours de l'évolution permettent de compenser la perte de cellules. Les mieux caractérisés chez la drosophile sont la prolifération dite compensatoire, ainsi que les mécanismes de réparation et de régénération. Récemment, un rôle de la durée du temps de développement des larves a également été mis en évidence dans le maintien de l'homéostasie tissulaire lorsque le tissu endommagé est un tissu larvaire non différencié. Le rôle de l'UPR n'a jamais été étudié dans la régulation de ces mécanismes après un stress du RE.

Le travail présenté dans ce manuscrit a pour but d'élucider les mécanismes induits par un stress du RE, qu'ils soient pro-apoptotiques ou impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Pour cela, un modèle drosophile consistant à surexprimer la préséniline en utilisant deux transgènes UAS-Psn+14 [8] a été utilisé pour sa capacité à activer un stress du RE indépendamment de son activité  $\gamma$ -sécrétase en cellules de mammifères [9, 10]. Le tissu ciblé est le disque imaginal d'aile qui a la caractéristique de présenter peu d'apoptose au cours de son développement et de présenter un fort pouvoir de régénération et de réparation.



# **I. Introduction**

## **II. Résultats**

## **III. Discussion**

## **IV. Matériels et méthodes**

## **V. Références bibliographiques**



Le concept d'homéostasie a été développé à partir de 1850 par le médecin physiologiste français Claude Bernard. Il recouvre la capacité que peut avoir un système quelconque (ouvert ou fermé) à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.

L'homéostasie tissulaire est assurée par un équilibre entre les processus de mort, prolifération, croissance, différenciation et migration cellulaires. Elle doit être contrôlée au cours du développement et chez l'adulte afin de permettre la mise en place, le maintien de la fonction et de la taille d'un tissu. Au cours du développement, la plupart des tissus augmente leur taille. Deux paramètres contribuent à cette croissance : le nombre et la taille moyenne des cellules les constituant. Cette dernière peut être contrôlée par les nutriments et des facteurs de croissance, tandis que le nombre de cellules est déterminé par un équilibre entre les processus de division, de migration et de mort cellulaires. Cette dernière pouvant être programmée (MCP) ou accidentelle. Ces processus sont finement contrôlés au cours du développement. L'importance de ce contrôle est illustrée par la différence de taille entre les individus de différentes espèces, alors que la taille des organes entre individus d'une même espèce est relativement constante. A la fin du développement, nombre de cellules subissent une étape de différenciation terminale qui leur permettra d'exercer leurs fonctions. Un renouvellement constant des cellules doit ensuite être maintenu tout au long de la vie afin d'assurer la fonction du tissu.

Une mauvaise régulation des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire peut aboutir au développement de pathologies. Ainsi les cancers et les maladies auto-immunes peuvent être dues à une prolifération excessive et/ou à une diminution de la MCP [11, 12]. A l'inverse, une MCP excessive est observée lors de maladies dégénératives, d'immunodéficiences, d'infertilité, ou bien encore, de déficiences hématopoïétiques [13].

Dans cette introduction, j'ai choisi de décrire les mécanismes régulant l'apoptose qui est la mort cellulaire programmée la plus courante, la prolifération cellulaire et la croissance tissulaire, ainsi que les mécanismes encore mal connus permettant de coupler ces deux phénomènes afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.



# **1. La mort cellulaire**

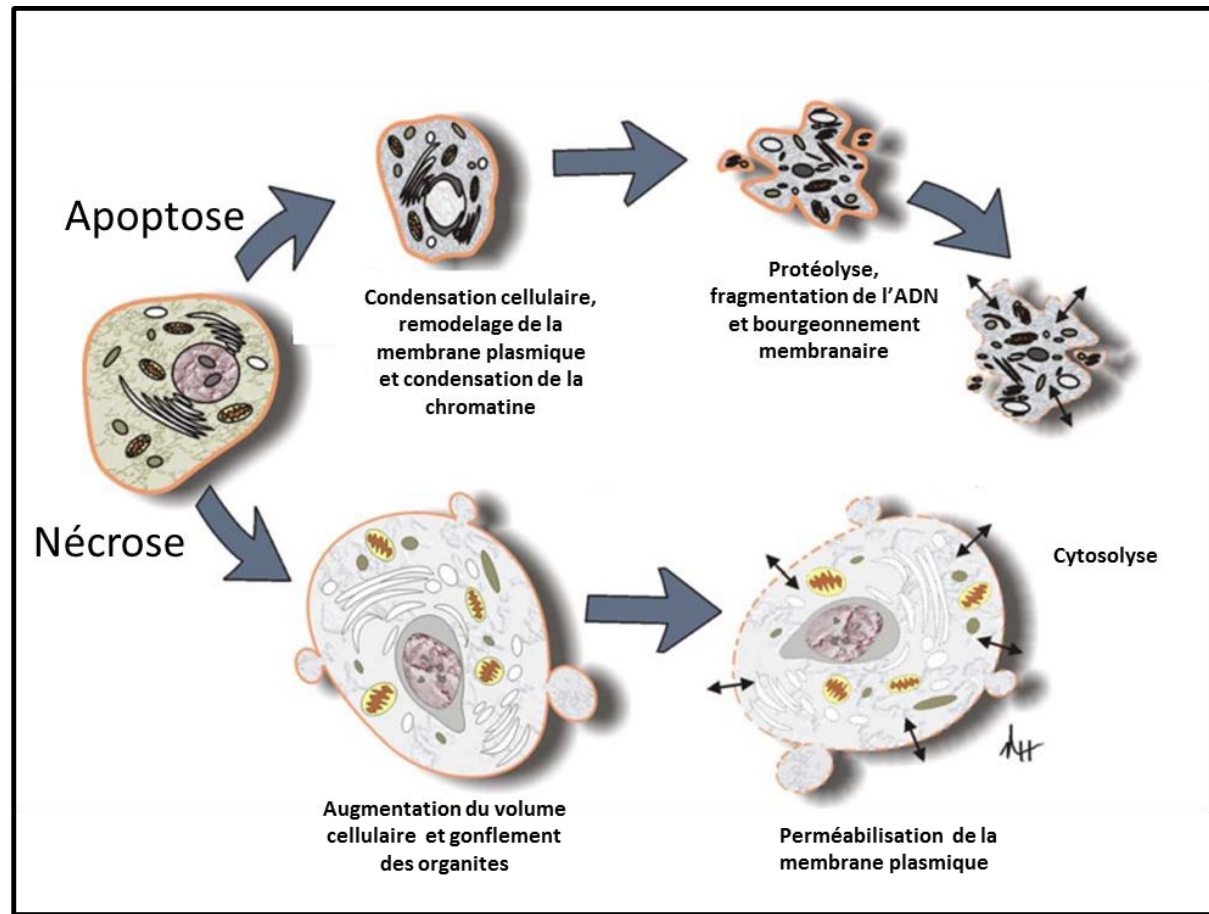
Les classifications les plus couramment utilisées reconnaissent trois grands types de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et la mort associée à l'autophagie [14]. L'apoptose et l'autophagie ont toujours été considérées comme étant deux types de morts cellulaires programmées tandis que la nécrose a longtemps été associée à la notion de mort accidentelle (Figure 1). Cependant, des données récentes montrent que l'exécution de la mort cellulaire nécrotique peut également être finement régulée par des voies de transduction et des mécanismes cataboliques [15]. Ces différentes morts se distinguent par des caractéristiques morphologiques et moléculaires qui leur sont propres. L'apoptose, qui est la plus étudiée, est nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement d'un organisme vivant. Elle se caractérise par un bourgeonnement membranaire, une rétraction des pseudopodes, une fragmentation nucléaire (karyorrhexis), une dégradation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) nucléaire et d'organites, ainsi que par une réduction du volume cellulaire (pyknosis) aboutissant à la formation de corpuscules apoptotiques. Ces derniers sont ensuite éliminés par phagocytose ou évacués dans une lumière, n'entraînant pas d'inflammation tissulaire [16]. C'est pourquoi l'apoptose est souvent qualifiée de mort propre contrairement à la nécrose qui conduit au déversement du contenu cellulaire dans l'organisme.

## **1.1.L'apoptose**

### **1.1.1. Les différents types d'apoptose**

#### **1.1.1.1. L'apoptose développementale**

L'apoptose joue un rôle crucial durant l'organogenèse et le remodelage des tissus. L'exemple le plus connu est l'élimination des cellules interdigitales chez les vertébrés. L'apoptose a également un rôle développemental chez la drosophile où elle intervient dans la formation des articulations des pattes, dans la morphogenèse des segments, en particulier ceux de la tête [17] ou bien encore dans l'élimination des cellules surnuméraires lors de l'établissement du système nerveux. L'apoptose est aussi requise pour permettre la rotation de 360° des organes génitaux mâles lors de leur morphogenèse chez la drosophile [18]. En plus de ce rôle



**Figure 1 : Apoptose versus nécrose.**

L'apoptose aboutit à la formation de corps apoptotiques qui seront éliminés par phagocytose grâce aux cellules environnantes et aux macrophages. Lors de la nécrose, l'augmentation du volume cellulaire, le gonflement des organites et la perméabilisation de la membrane plasmique contribuent à la rupture de la membrane plasmique et à la libération dans le milieu environnant du contenu cellulaire, déclenchant ainsi une réaction inflammatoire. Il est à noter qu'il n'y a pas ou peu de remodelage de la chromatine lors la nécrose durant laquelle les cellules succombent rapidement par cytolysse. Adapté de [19].

consistant à sculpter les tissus, l'apoptose permet d'éliminer des structures entières. Chez les insectes, l'exemple le plus marquant est l'élimination de structures larvaires telles que les glandes salivaires durant la métamorphose [20].

Dans le cas de l'apoptose développementale, les stimuli sont des facteurs développementaux tel que l'ecdysone, une hormone impliquée dans le développement et la métamorphose des insectes [21], ou bien encore des facteurs de croissance comme des membres de la famille des Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) lors de l'élimination des cellules interdigitales chez les vertébrés.

#### **1.1.1.2. L'apoptose accidentelle**

En plus de son rôle développemental, l'apoptose est impliquée dans l'élimination de cellules endommagées ou dangereuses pour l'organisme. Cette apoptose est une réponse à différentes formes de stress telles que des dommages de l'ADN, une blessure physique, une accumulation de protéines mal conformées, une infection virale, une ischémie, un stress oxydatif ou bien encore un stress du réticulum endoplasmique (RE) [22]. Contrairement à l'apoptose développementale, l'apoptose accidentelle nécessite une compensation afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

#### **1.1.2. Les caspases**

La régulation et l'exécution de l'apoptose sont fortement conservées chez les métazoaires. Au niveau moléculaire, les apoptoses développementales et accidentelles sont caractérisées par l'activation des caspases (Cysteinyl aspartate cleaving protease). Les caspases sont des protéases présentant une cystéine dans leur site catalytique qui sont capables de réaliser un clivage après un résidu aspartate (ou glutamate dans certains cas). Les caspases zymogènes sont constituées de trois domaines : un prodomaine amino-terminal, un grand (p20) et un petit (p10) domaine catalytique. La majorité des caspases fonctionne dans une cascade d'auto- ou de trans-activation dans laquelle les caspases constituées d'un long pro-domaine N-terminal (caspases initiateuses) vont activer par clivage les caspases constituées d'un pro-domaine N-terminal plus court (caspases effectrices). Chez les mammifères, 18 caspases, annotées de 1 à 18, ont été découvertes jusqu'à présent. Certaines ont un rôle majeur dans le déclenchement

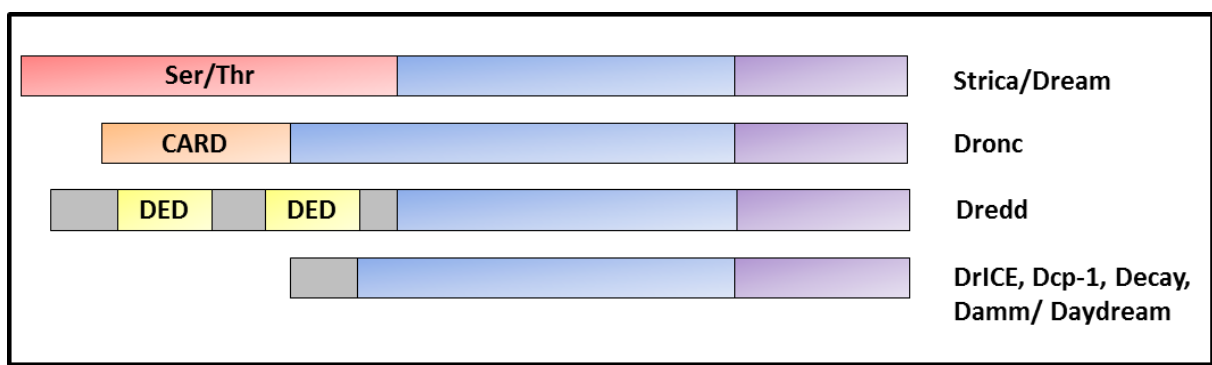
de l'apoptose, c'est le cas des caspases-2, -8, -9 et -10 qui sont des caspases initiatrices et des caspases -3, -6 et -7 qui sont des caspases effectrices [23]. Le génome de la drosophile code sept caspases distinctes (Figure 2) : Dronc (Drosophila Nedd-2-like caspase), Strica /Dream (Ser/Thr-rich caspase.), Dredd (Death related ced-3/Nedd2-like), DrICE (Drosophila ICE), Dcp-1 (Death caspase-1), Decay (Death executioner caspase related to apopain/Yama), Damm/Daydream (Death-associated molecule related to Mch2) [24]. Dronc, Dredd et Strica sont qualifiées de potentielles caspases initiatrices en fonction de la taille de leur pro-domaine tandis que les quatre autres sont de potentielles caspases effectrices. La caspase initiatrice Dronc (orthologue de la caspase-9) et la caspase effectrice DrICE (orthologue de la caspase-3) sont les deux caspases qui ont un rôle majeur durant l'apoptose chez la drosophile. La maturation et l'activation des caspases représentent le point de non-retour de l'apoptose chez des animaux aussi divers que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et les mammifères [25-27].

Une fois activées, les caspases effectrices vont cliver des substrats cellulaires, tels que des kinases, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, des protéines impliquées dans la transduction de signaux, et ainsi promouvoir l'apoptose. Les caspases peuvent être activées par deux types de voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Ces deux voies d'activation sont retrouvées aussi bien chez les mammifères que chez les arthropodes ; elles sont conservées au cours de l'évolution. Néanmoins, les mécanismes qu'elles mettent en jeu peuvent légèrement différer d'une espèce à l'autre, avec une complexité plus importante chez les mammifères.

## **1.2. La voie mitochondriale de l'apoptose**

### **1.2.1. La voie mitochondriale de l'apoptose chez les mammifères**

La voie mitochondriale, ou intrinsèque, est utilisée en réponse à des dommages intracellulaires causés, par exemple, par des cassures de l'ADN, un stress oxydatif, un déficit de nutriments mais également en réponse à des signaux extracellulaires. Elle se caractérise par un rôle central de la mitochondrie. Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) prennent une part importante dans la régulation de l'activation de cette voie.



**Figure 2 : Les caspases de drosophile.**

La petite (en violet) et la grande sous-unité (en bleu) ainsi que les motifs d'interaction protéine-protéine (comme les motifs DED et CARD) des différentes caspases sont représentés. Les caspases initiatrices Dredd, Dronc et Strica contiennent un long prodomaine tandis que celui des caspases effectrices DrICE, Dcp-1, Decay, Damm/Daydream est court. Il est à noter que le prodomaine de Strica ne contient pas de motif d'interaction protéine-protéine. La forme active des caspases est générée par un clivage permettant de séparer la grande sous-unité de la petite. CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain; DED : Death Effector Domain. D'après [24].

### **1.2.1.1. Les membres de la famille Bcl-2**

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être réparties en trois groupes en fonction de leur structure, c'est-à-dire du nombre de domaines BH (Bcl-2 Homology) qui les compose et de leur rôle dans l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 et A1/Bfl-1 sont caractérisées par la présence de quatre domaines BH, BH1 à BH4. Le domaine BH4 est impliqué dans le contrôle de leur fonction anti-apoptotique tandis que le domaine BH3 leur permet de former des interactions avec d'autres protéines possédant un domaine BH3. Le second groupe composé de protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, Bak et Bok/Mtl, sont constituées des domaines BH1 à BH3. Le dernier groupe est constitué de protéines pro-apoptotiques comme Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 et Hrk/DP5 qui ne contiennent qu'un domaine BH3 et qui portent le nom de protéines pro-apoptotiques « BH3-only » [28].

### **1.2.1.2. Activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2**

L'activation des protéines pro-apoptotiques telles que Bax est régulée par un ensemble de mécanismes qui modulent sa translocation du cytosol à la membrane externe des mitochondries après un stimulus apoptotique. Cette relocalisation est due à un changement de conformation qui serait causé par les protéines « BH3-only » telles que Bim ou Bid. La protéine tBid qui est une forme tronquée de Bid servirait de récepteur à Bax et permettrait son insertion et son oligomérisation au niveau de la membrane externe de la mitochondrie [29]. Cette accumulation de Bax à la mitochondrie peut être inhibée par les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-x<sub>L</sub> qui favorisent la retranslocation de Bax dans le cytoplasme. Les protéines « BH3-only », en restant liées avec Bax ou en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques, peuvent inhiber la fonction de ces dernières. Cette relocalisation des protéines pro-apoptotiques à la mitochondrie favorise la perméabilisation de la membrane externe (Figure 3).

### **1.2.1.3. Conséquences de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale**

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie favorise le relargage de facteurs pro-apoptotiques. Le relargage dans le cytosol du cytochrome C est l'élément prépondérant du déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque chez les mammifères. Le cytochrome C peut alors interagir avec la protéine cytosolique Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1). Cette liaison, parallèlement à celle de l'adénosine triphosphate (ATP), provoque un changement de conformation et une oligomérisation d'Apaf-1 en une structure heptamérique appelée apoptosome qui recrute et stimule l'activation de la caspase initiateur 9.

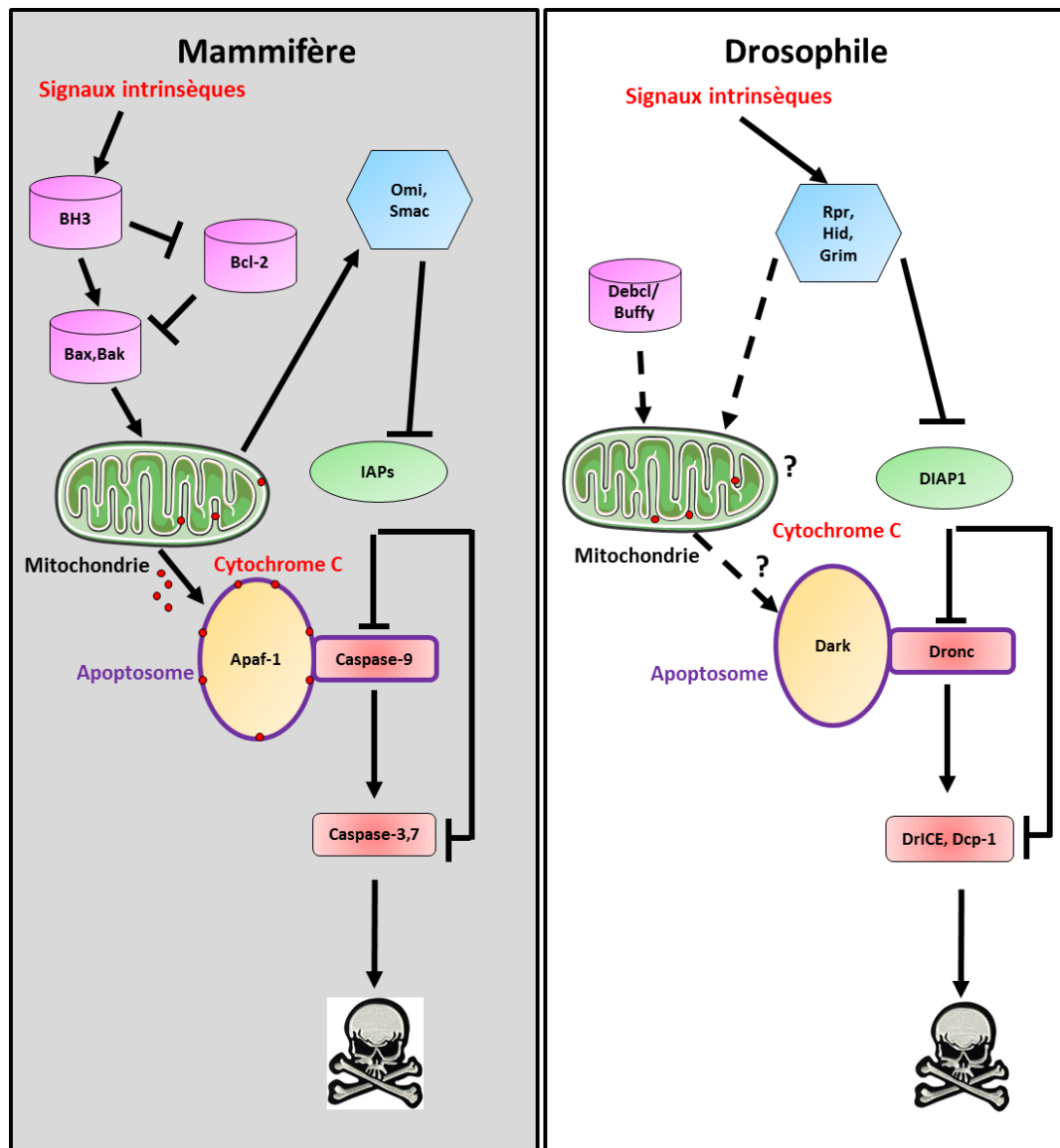
D'autres facteurs tels que Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont également libérés dans le cytoplasme après la perméabilisation de la membrane externe. Ces protéines inhibent les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui empêchent l'activation des caspases. Des facteurs pro-apoptotiques, comme l'AIF (Apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G, sont également libérés. Suite à leur translocation au noyau, ces facteurs facilitent la fragmentation de l'ADN.

## **1.2.2. La voie intrinsèque chez la drosophile**

### **1.2.2.1. Les membres de la famille Bcl-2**

Tout comme chez les mammifères, le génome de la drosophile code au moins deux membres de la famille Bcl-2 [30], connus sous le nom de Debcl et Buffy (Figure 3). Ces deux protéines appartiennent structurellement au groupe des protéines pro-apoptotiques car elles contiennent les domaines BH1, BH2, BH3 [31, 32] et présentent une forte homologie de séquence avec la protéine pro-apoptotique Bok de mammifère. Par contre, aucune protéine anti-apoptotique contenant les domaines BH1 à BH4, même si le domaine BH4 reste difficile à caractériser, et aucune protéine « BH3-only » n'a encore été identifiée chez la drosophile.

En dépit de cette forte homologie de séquence avec la protéine pro-apoptotique Bok, le rôle de Buffy et Debcl dans la régulation de l'apoptose reste peu clair. En effet, différentes études montrent que ces protéines peuvent avoir des effets différents suivant le type de stress et de tissu. Par exemple, l'expression de Debcl serait pro-apoptotique dans différents tissus tels que



**Figure 3 : Comparaison entre les voies intrinsèques d'apoptose chez les mammifères et la drosophile.**

Les protéines impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose sont conservées chez les mammifères et la drosophile. Cependant le processus menant à l'activation des caspases est différent. Les membres d'une même famille protéique sont identifiés par la même couleur. Chez les mammifères (à gauche), la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par l'activation de protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak est l'élément clé. Elle promeut le relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome C, Smac et Omi. Le cytochrome C interagit alors avec la protéine cytosolique Apaf-1 permettant le recrutement et l'activation de la caspase initiateur 9 au sein de l'apoptosome (entouré de violet). Smac et Omi facilitent l'activation des caspases en inhibant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP). Chez la drosophile (à droite), la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ne jouerait pas un rôle prépondérant dans l'activation des caspases. Chez cet organisme, leur activation est essentiellement dépendante de la quantité de DIAP1 qui est dégradée par les protéines de la famille RHG. D'après [33].



le disque d'aile, les glandes salivaires ou le cerveau [31] mais Debcl peut également être anti-apoptotique [34]. Une étude récente montre que Debcl exerce une fonction limitée durant l'apoptose puisqu'elle ne semble pas être impliquée de manière globale durant l'apoptose développementale ni lors d'un stress génotoxique et que *debcl* n'est pas un gène essentiel. Debcl aurait un rôle essentiellement durant l'élimination des cellules surnuméraires dans le système nerveux central [35].

Tout comme Debcl, Buffy pourrait avoir un rôle pro-apoptotique car la déplétion de Buffy inhibe la mort induite par l'expression du gène pro-apoptotique Grim, un des homologues de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 chez les mammifères, dans les disques imaginaires d'œil [36]. Néanmoins, Buffy est classiquement décrite comme anti-apoptotique. L'inhibition de l'expression de Buffy induirait une augmentation de l'apoptose développementale embryonnaire tandis que sa surexpression l'inhiberait [32]. Ces différentes expériences montrent que le rôle des membres de la famille Bcl-2 dans le déroulement de l'apoptose chez la drosophile reste à ce jour mal compris.

#### **1.2.2.2. Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et relargage du cytochrome C**

Tandis que la mitochondrie et le cytochrome C ont un rôle prépondérant dans l'activation de la voie intrinsèque chez les mammifères, leur rôle chez la drosophile reste controversé (Figure 3). L'étude ultrastructurale de Dark (Drosophila Apaf-1-related killer), l'homologue d'Apaf-1, qui active la caspase initiateur Dronc ne révèle pas d'interaction avec le cytochrome C lors de la formation de l'apoptosome [37]. Néanmoins, une étude antérieure suggère que le cytochrome C pourrait avoir un rôle durant l'apoptose chez la drosophile. En effet, elle montre que Dark peut immunoprécipiter avec le cytochrome C en cellules Schneider 2 (S2) après induction de l'apoptose [38].

L'existence d'une libération du cytochrome C dans le cytosol lors du déroulement de l'apoptose reste controversée. Le cytochrome C ne serait pas libéré dans le cytosol durant l'apoptose en cellules S2 après induction d'un stress génotoxique [39], alors que l'expression de l'antagoniste des IAP *reaper*, un des homologues de Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 chez les mammifères, induirait une libération du cytochrome C. Le relargage du cytochrome C ne semble donc pas être un bon marqueur de l'apoptose chez la drosophile et il pourrait dépendre du type de stress induit.

L'implication du cytochrome C dans le déroulement de l'apoptose varie suivant les études. En effet, l'inhibition du cytochrome C ne module pas la mort induite par différents stress génotoxiques en cellules S2 [39, 40] mais elle la ralentit durant le développement de la rétine [41]. Par ailleurs, elle diminue l'activation des caspases durant l'individualisation des spermatides [42]. Cet ensemble de données montre que le cytochrome C pourrait être impliqué dans la mort cellulaire chez la drosophile mais que son rôle dépend, entre autres, du tissu et du type de stress.

#### **1.2.2.3. Fragmentation de la mitochondrie**

Bien qu'il n'y ait à ce jour aucune preuve évidente de l'implication des membres de la famille Bcl-2 et du cytochrome C dans l'activation des caspases chez la drosophile, il semblerait néanmoins que la mitochondrie ait un rôle significatif dans le programme de mort cellulaire. En effet, l'inhibition de la fission mitochondriale peut inhiber l'apoptose, ce qui suggère que la fragmentation de la mitochondrie est également impliquée dans le processus apoptotique chez la drosophile [12, 43]. La fission mitochondriale ne serait pas le seul mécanisme qui impliquerait la mitochondrie dans l'apoptose. Il s'avère en effet que la protéine Marf (Mitochondrial assembly regulatory factor), qui est impliquée dans la fusion mitochondriale, favoriserait le recrutement de Reaper à la mitochondrie [43]. Cette relocalisation de Reaper à la mitochondrie (Figure 3) durant le processus apoptotique aurait comme conséquence de diminuer la dégradation de Reaper provoquant ainsi une augmentation de la dégradation de DIAP1 (Drosophila inhibitor of apoptosis 1), un des homologues des IAP de mammifères, qui inhibe l'activation des caspases effectrices. Cette augmentation de la dégradation de DIAP1 induit le processus apoptotique [44]. La mitochondrie semble donc avoir un rôle important dans le déroulement de l'apoptose chez la drosophile, indépendamment des membres de la famille Bcl-2 et du relargage des facteurs pro-apoptotiques tel que le cytochrome C.

#### **1.2.2.4. Les principaux acteurs**

La formation de l'apoptosome ne semble pas être le point central de l'induction de l'apoptose chez la drosophile. En effet, le relargage du cytochrome C ne semble pas être fondamental pour la réalisation de l'apoptose chez la drosophile. Par ailleurs, la surexpression de *dark* est insuffisante pour activer la mort cellulaire dans des cellules saines exprimant fortement *Dronc* dont le produit peut être activé par Dark en absence de signaux apoptotiques [45]. Néanmoins,

Dark pourrait être important car sa perte de fonction peut inhiber l'apoptose [46], sans être l'élément clé de la régulation de l'apoptose. Chez la drosophile, ce facteur clé semble être DIAP1, dont la dégradation est suffisante pour activer les caspases [47].

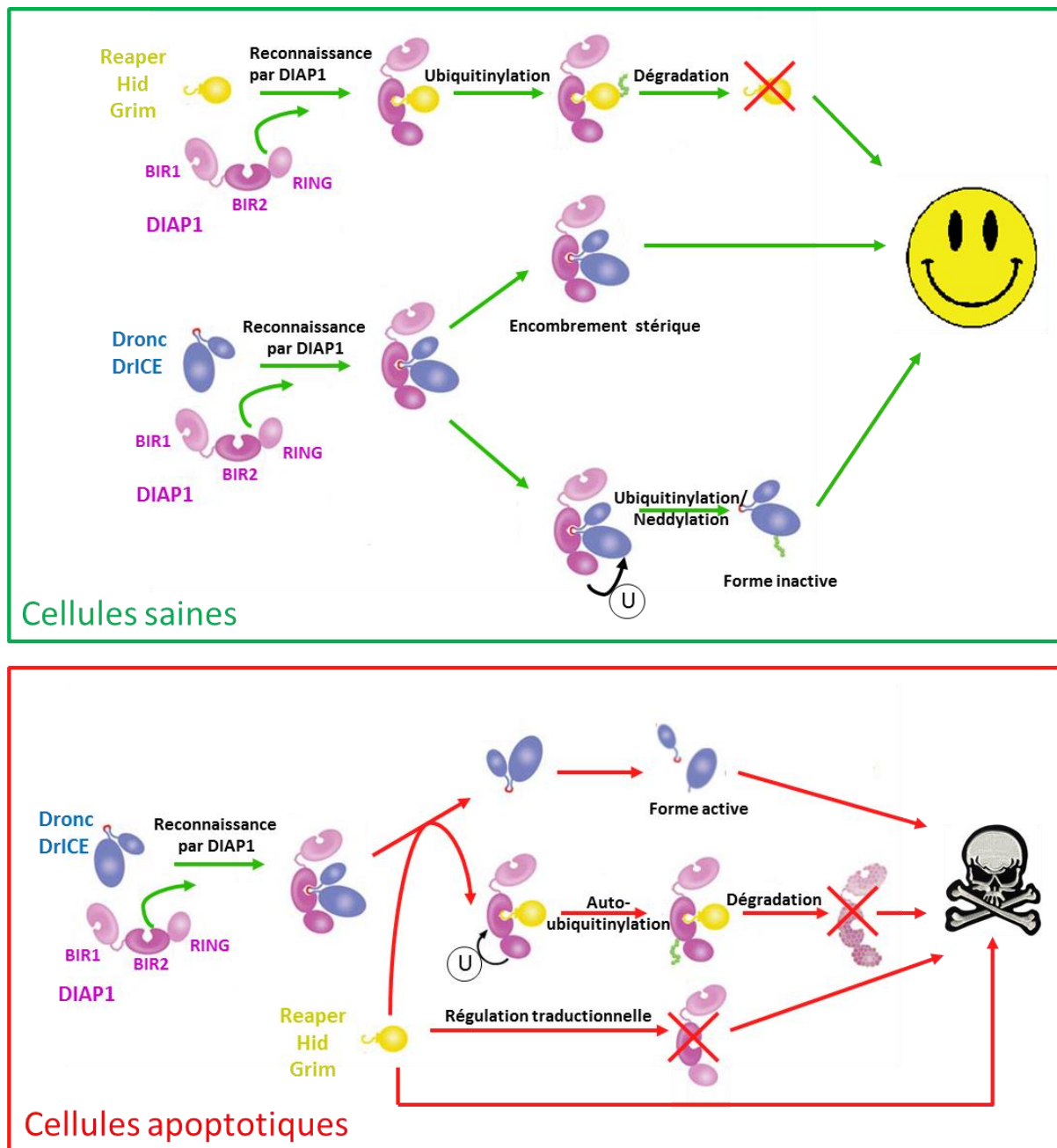
#### 1.2.2.4.1. DIAP1

Les IAP sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine BIR (Baculovirus inhibitory repeat). Ce domaine caractéristique a permis d'identifier quatre IAP chez la drosophile, nommées DIAP1, DIAP2, dBruce et Détérine. Ces protéines sont capables d'inhiber l'activité des caspases par divers mécanismes dans des systèmes différents. Je vais me concentrer sur DIAP1 qui est la IAP présentant un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose chez la drosophile. En effet, sa perte de fonction est suffisante pour induire une apoptose massive entraînant une létalité embryonnaire [48, 49]. Cette mort est dépendante de Dark et des caspases Dronc et DrICE [45] puisqu'elle est supprimée en conditions mutantes pour les gènes codant ces différents éléments.

Le domaine BIR permet la liaison des IAP avec les caspases et les protéines RHG (Reaper Hid Grim), leurs antagonistes, en interagissant avec leur domaine IBM respectifs (IAP binding motif). DIAP1 possède également un domaine RING (Really interesting new gene), qui n'est pas impliqué dans l'interaction avec les caspases et les protéines RHG [50] mais qui confère aux IAP une activité d'ubiquitine ligase E3.

Dans le système ubiquitine-protéasome, l'ubiquitylation des protéines ciblées est induite par le transfert séquentiel de l'ubiquitine de l'enzyme d'activation E1 à l'enzyme de conjugaison E2 qui par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase E3 transfère l'ubiquitine sur des résidus lysine des protéines ciblées. Suivant la lysine ciblée, l'effet de la polyubiquitylation sera différent. Par exemple, celle de la lysine 48 peut avoir comme effet de diriger la protéine vers le protéasome 26S où elle sera dégradée, contrairement à celle de la lysine 63 qui favorise une modification de l'activité de la protéine ciblée [51].

Pour inhiber la mort, différentes stratégies sont utilisées par DIAP1 (Figure 4). Tout d'abord DIAP1 est capable de polyubiquityler les caspases par son domaine RING. Il semblerait que cette polyubiquitylation favorise l'inhibition de l'activité catalytique de DrICE car elle empêche le clivage de PARP (Poly ADP-ribose polymerase), une cible catalytique des caspases effectrices [52], et l'auto-activation de DrICE [53].



**Figure 4 : Rôle central de DIAP1 dans la régulation de l'apoptose chez la drosophile.**

Dans les cellules saines (cadre vert), DIAP1 inhibe l'apoptose en favorisant la dégradation des protéines pro-apoptotiques Rpr, Hid et Grim (RHG), mais également en permettant l'inactivation des caspases initiateurs et effectrices en les piégeant (encombrement stérique) ou en induisant des modifications post-traductionnelles (ubiquitinylation (U) ou neddylation). Dans les cellules ayant reçu un stimulus apoptotique (cadre rouge), l'expression des gènes *rpr*, *hid* et *grim* est induite. Leur produit médie la diminution de la quantité de DIAP1 en favorisant son auto-ubiquitinylation et sa dégradation ou en diminuant sa traduction. La diminution de DIAP1 favorise l'activation des caspases qui peuvent ainsi cliver leurs cibles et par conséquent induire la mort de la cellule par apoptose. Les protéines RHG peuvent également induire l'apoptose indépendamment des caspases. Adapté de [54].

Tout comme DrICE, Dronc subit une polyubiquitinylation médiée par DIAP1 qui n'entraîne pas sa dégradation [54] mais empêche son activation par Dark [55].

DIAP1 ne fonctionne pas uniquement comme une ubiquitine ligase. En effet, elle est également capable de neddyler ses partenaires, c'est-à-dire de transférer covalamment à ses protéines cibles NEDD8, une protéine ressemblant à l'ubiquitine (Figure 4). Elle se comporte donc également comme une NEDD8-E3 ligase. La neddylation de DrICE diminue l'activité catalytique caspasique, tout comme la polyubiquitinylation, ce qui aboutit à une diminution de l'apoptose. Cette neddylation est également dépendante du domaine RING de DIAP1 [56].

DIAP1 peut également inhiber par encombrement stérique l'activité catalytique des caspases, suite à une interaction physique et une occupation du site de liaison des substrats des caspases (Figure 4). En effet, le domaine BIR1 est nécessaire et suffisant à l'inhibition de l'activité catalytique de DrICE [57].

Enfin, la dernière des stratégies de DIAP1 pour inhiber l'induction de l'apoptose est de dégrader les protéines de la famille RHG (Figure 4). Ces protéines sont des cibles de l'ubiquitinylation médiée par le domaine RING de DIAP1. Elle entraîne la dégradation des protéines RHG par le protéasome [58].

#### 1.2.2.4.2. Les antagonistes des IAP : les protéines RHG

Les protéines RHG ont été mises en évidence par l'utilisation de la déficience *H99*. Les individus homozygotes mutants *H99* sont dépourvus de mort développementale et de mort induite par les irradiations. La délétion *H99* couvre 300 Kb de la région 75C1 du chromosome 3L. Cette région délétée contient les 3 gènes codant les 3 principaux antagonistes des IAP que sont Hid (Head involution defective), Reaper et Grim. Trois autres protéines de la famille RHG ont été découvertes plus tardivement. La protéine Jafrac2, d'abord mise en évidence pour son profil d'expression, a ensuite été identifiée comme capable d'interagir avec les IAP. Sickie a été mise en évidence par une analyse *in silico* recherchant un motif IBM tandis que dOmi, a été identifiée par sa similitude de séquence avec Omi, un antagonisme des IAP chez les mammifères. La surexpression de ces protéines est suffisante pour induire de la mort. Je détaillerai le rôle de Reaper, Hid et Grim étant donné que ce sont les trois protéines RHG qui semblent avoir un rôle prépondérant dans l'induction de l'apoptose chez la drosophile.

Reaper, Hid et Grim sont capables de lever l'inhibition des caspases DrICE, Dcp-1 et Dronc médiée par DIAP1 [45, 57] en utilisant, deux stratégies (Figure 4). Tout d'abord, Reaper et

Grim diminuent la quantité de DIAP1 en abaissant la traduction générale sans affecter le niveau de la transcription [45]. Les caspases ayant une plus longue durée de vie que DIAP1, la diminution de DIAP1 aboutit à leur libération [59]. Reaper et Hid sont également capables d'induire la dégradation de DIAP1 en favorisant son auto-polyubiquitinylation et son adressage au protéasome [59].

Tout comme les caspases, les protéines RHG interagissent avec les domaines BIR de DIAP1, créant de la compétition entre ces deux types de protéines (Figure 4) [60]. Les protéines RHG interagissent avec les mêmes résidus que les caspases à la surface de ces domaines BIR [54, 61] et présentent une meilleure affinité pour DIAP1 que les caspases. Cette compétition entraîne donc le relargage des caspases par DIAP1 [61].

Les protéines RHG sont également capables d'activer les caspases indépendamment de l'antagonisation des IAP (Figure 4). En effet, la mort induite par Hid requiert l'activité des caspases Strica, Decay, Dronc/Dark et DrICE tandis que la mort induite par la dégradation de DIAP1 implique essentiellement l'activation de Dronc/Dark et de DrICE [62].

Chez la drosophile, l'inhibition de DIAP1 par les protéines RHG semble être l'évènement primordial lors du déclenchement de l'apoptose. Néanmoins, DIAP1 peut également être régulée indépendamment des protéines RHG. Cette régulation peut être post-traductionnelle. En effet, il existe des boucles de rétrocontrôle de l'activité de DIAP1 qui sont dépendantes des caspases. Par exemple, Dronc peut inhiber l'activation de DIAP1 en modifiant sa conformation après un clivage spécifique. A l'inverse, DrICE, est capable d'augmenter l'activité de DIAP1 en clivant son extrémité N-terminale [60]. Cette régulation de la quantité de DIAP1 peut également dépendre de la stabilité de son transcrit. Ainsi, la protéine de liaison à l'acide ribonucléique (ARN) HOW (Held Out Wing) a la capacité de déstabiliser l'ARN messenger (ARNm) de *diap1* [63].

### **1.3. La voie extrinsèque de l'apoptose**

#### **1.3.1. La voie extrinsèque chez les mammifères**

La voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 5) est activée par des signaux extracellulaires. Elle joue surtout un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans le système immunitaire. Elle est initiée par la fixation de ligands spécifiques tels que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), FasL (Fas Ligand) et TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Induced

Ligand) à leur récepteur spécifique. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs à domaine de mort et sont caractérisés par leur domaine cytosolique appelé Death Domain (DD). Ils peuvent être divisés en deux groupes en fonction des protéines adaptatrices recrutées au niveau de la région cytoplasmique, après fixation de leur ligand [64].

#### **1.3.1.1. Le groupe 1**

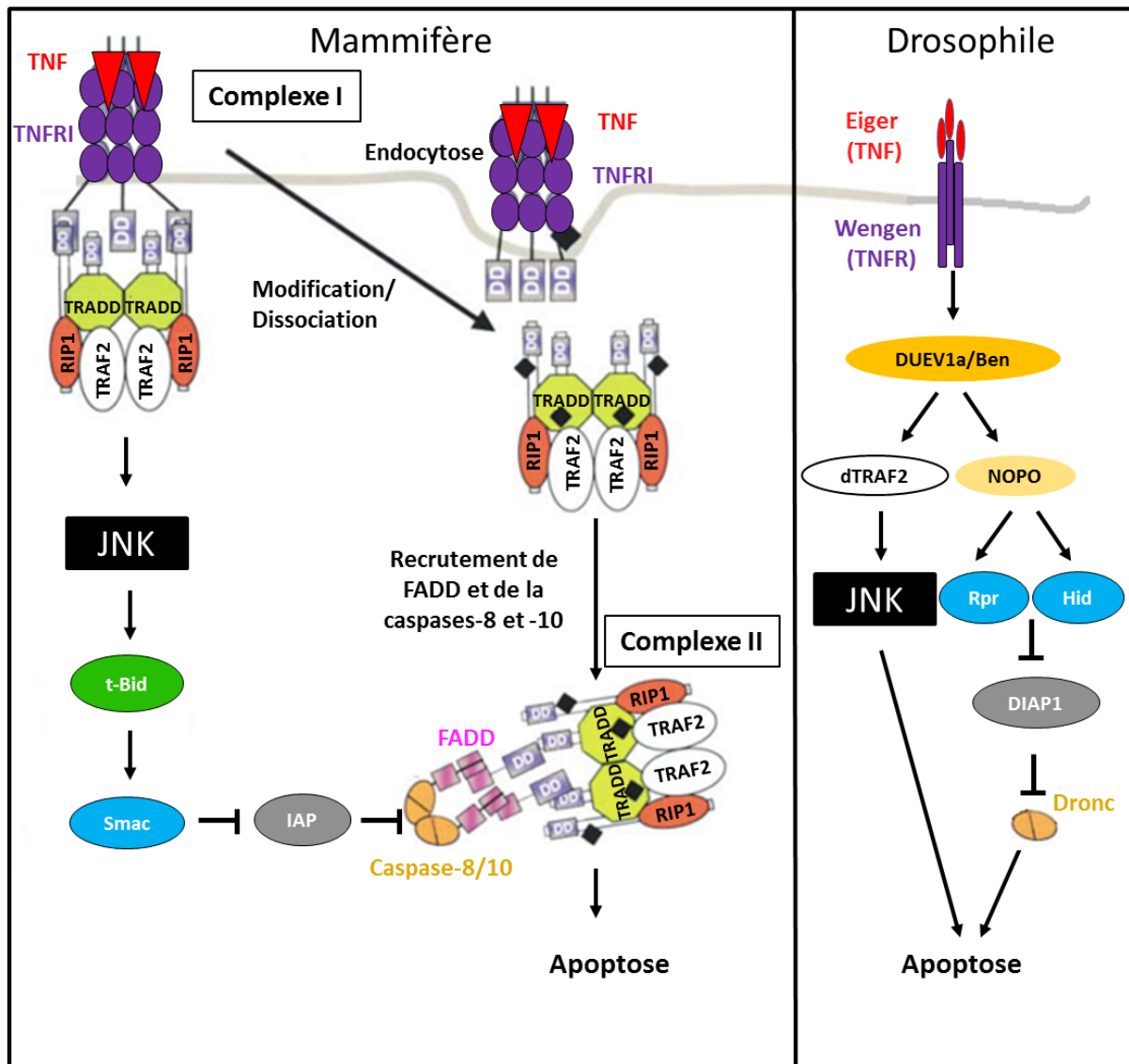
Le premier groupe incluant, entre autres, les récepteurs CD95/Fas, TRAIL-R1 et TRAIL-R2 favorise la formation d'un complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) qui est composé de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated with Death Domain) et des pro-caspases-8 et 10. Le DISC favorise l'auto-clivage des pro-caspases, en permettant leur regroupement. Une fois maturées, les caspases sont relâchées et peuvent activer les caspases effectrices telles que les caspases-3 et -6. Ce mécanisme est retrouvé dans les lymphocytes et les thymocytes. Dans d'autres types cellulaires, comme les hépatocytes et les cellules  $\beta$  du pancréas, un clivage de la protéine Bid par la caspase-8 en une forme tronquée tBid est requis pour induire la mort cellulaire. tBid induit la relocalisation de Bak et Bax à la mitochondrie entraînant la perméabilisation de la mitochondrie et l'activation de la voie intrinsèque d'apoptose [65].

#### **1.3.1.2. Le groupe 2**

Le second groupe des récepteurs à domaine de mort inclut des récepteurs qui peuvent avoir un rôle anti-apoptotique et un rôle pro-apoptotique. Il contient, entre autres, le récepteur TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1). Après la fixation de leur ligand, ces récepteurs recrutent la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor–Associated protein with a Death Domain) et la sérine-threonine kinase RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1).

Le rôle anti-apoptotique de TNFR1 est associé au recrutement de la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) par TRADD. Ce complexe, nommé complexe I, qui est constitué du récepteur TNFR1, de TRADD, de RIP1 et de TRAF2, reste localisé à la membrane plasmique. Il permet l'activation de la voie NF $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa-B) qui se traduit par l'expression de gènes codant des facteurs de survie et des protéines anti-apoptotiques, favorisant ainsi la survie cellulaire [66].

Le rôle pro-apoptotique de TNFR1 est associé à la désubiquitinylation de RIP1 qui induit l'internalisation du complexe. Ce dernier, appelé complexe II, déclenche les mécanismes de MCP en recrutant FADD et les caspases-8 et -10 (Figure 5) [66].



**Figure 5 : Comparaison entre la voie extrinsèque de mammifère et la voie extrinsèque de drosophile.**

La voie de transduction du signal du TNF n'est pas conservée au cours de l'évolution, en particulier au niveau de sa réception. En effet, le récepteur de drosophile Wengen est dépourvu de domaines de mort (DD) dans sa région cytoplasmique. Par ailleurs, le mode d'action des membres de la famille des TRAF diffère. Chez les mammifères (à gauche), TRAF2 induit de l'apoptose dépendante des caspases. Chez la drosophile (à droite), son orthologue induit de l'apoptose indépendante des caspases via la voie JNK. Les membres de la même famille protéiques sont identifiés par la même couleur. DD : Domaine de mort.



Ce complexe est également capable d'activer des voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) comme la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la voie p38. L'activation de la voie JNK favorise le clivage de Bid, indépendamment de la caspase-8, ce qui aboutit spécifiquement au relargage du facteur pro-apoptotique Smac hors de la mitochondrie. L'activation de cette voie n'aurait pas d'effet sur le relargage du cytochrome C par la mitochondrie [67].

### **1.3.2. La voie extrinsèque chez la drosophile : la voie Eiger/Wengen**

A ce jour, un seul membre de la famille des TNF a été identifié chez la drosophile. Il possède 20 à 25% d'homologie avec le domaine C-terminal des TNF de mammifère. Il est codé par le gène *eiger* (Eda-like cell death trigger) qui est essentiellement exprimé dans le système nerveux (Figure 5) [68].

Jusqu'à présent, seul un membre de la famille des TNFR a été rapporté dans la littérature [69]. Il s'agit de Wengen qui contient un domaine riche en cystéine, une caractéristique des TNFR. Cependant, il ne possède ni domaine de mort DD, ni domaine de liaison à TRAF2 [69], dont l'homologue de drosophile est DTRAF1 (Drosophila TNF receptor associated factor1), suggérant une voie de transduction du signal différente de celle décrite chez les mammifères. Certains éléments de cette signalisation semblent néanmoins conservés car le couple Eiger/Wengen peut également induire l'apoptose via la voie JNK [68, 69]. Cette activation pourrait dépendre, comme chez les mammifères, d'un membre de la famille des TRAF [70, 71]. Un candidat est DTRAF2, l'homologue de TRAF6, qui immunoprécipite avec Wengen [72], bien qu'aucun domaine de liaison n'ait été mis en évidence. Il est à noter que la mort induite est indépendante des caspases, contrairement à ce qui a été décrit chez les mammifères [68, 69].

Dans le cas de motoneurones endommagés, l'apoptose induite par Eiger/Wengen est indépendante de la voie JNK mais elle nécessite l'activation des caspases [73]. Deux voies d'induction de la mort semblent donc exister après activation de la voie Eiger/Wengen (Figure 5). La première serait induite par l'activation de la voie JNK et pourrait être indépendante des caspases [68, 74] et la seconde serait dépendante de ces protéases. L'ubiquitine ligase E2 formée de l'hétérodimère BEN-DUEV1A (Bendless-Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme variant 1a) régulerait l'activation de ces deux voies en activant, d'une part, l'ubiquitine ligase E3 NOPO (No poles) et, d'autre part, la voie JNK. NOPO induirait l'expression des membres de la famille RHG, Rpr et Hid, activant ainsi les

caspases [74]. La voie JNK pourrait, quant à elle, moduler le métabolisme de production d'énergie au sein de la mitochondrie, favorisant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène, et l'apoptose [75].

### **1.3.3. Apoptose régulée par la voie JNK chez la drosophile**

#### **1.3.3.1. La voie JNK**

La voie JNK est une voie de réponse au stress qui m'a particulièrement intéressée tout au long de ma thèse. C'est l'une des trois voies MAPK conservées chez les métazoaires avec la voie p38 et la voie ERK (Extracellular signal-Related Kinase). Ces voies MAPK regroupent des protéines kinases qui phosphorylent des résidus thréonine et sérine spécifiques de leur substrats protéiques. Elles permettent d'intégrer différents signaux créés par des stimuli extra- ou intra-cellulaires contrôlant ainsi la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose [76].

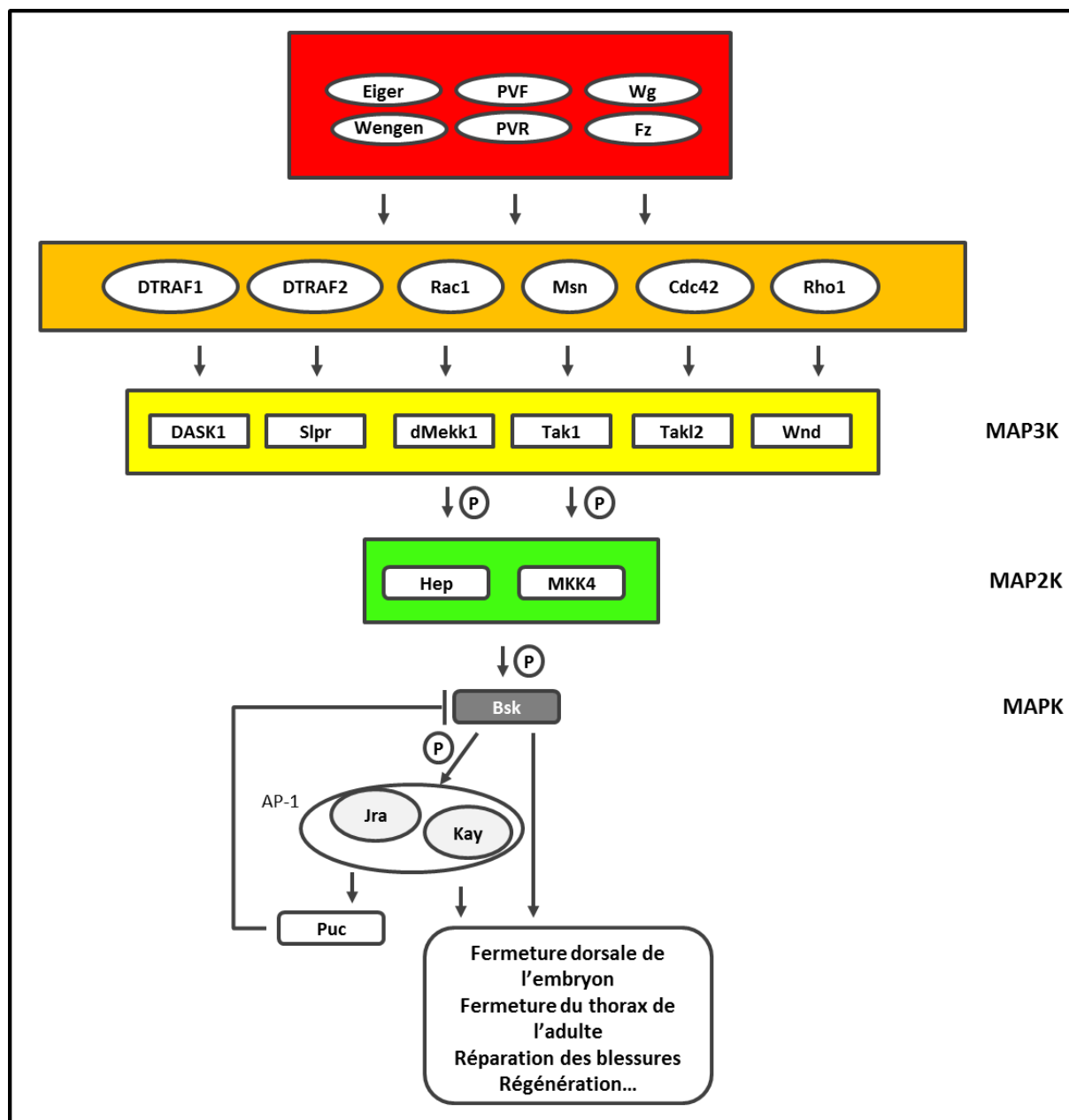
La voie JNK, qui est également appelée voie SAPK (Stress-Activated Protein Kinase), a été découverte dans les années 1990. Chez les mammifères, les protéines JNK sont codées par trois gènes nommés *jnk1*, *jnk2* et *jnk3*. La redondance fonctionnelle de ces différentes protéines complique l'analyse de la signalisation de la voie [76]. Chez la drosophile, cette analyse est simplifiée par le fait qu'il n'existe qu'une protéine JNK nommée Basket (Bsk). La voie JNK est impliquée dans différents processus biologiques chez la drosophile, tels que la fermeture dorsale de l'embryon [77], la fermeture du thorax de l'adulte [78], l'éversion des disques imaginaux d'aile [79], la cicatrisation des plaies [80], la longévité [81], la réponse immunitaire [82], l'invasion des cellules tumorales [83] et, bien entendu, l'apoptose [68]. Cette voie peut être activée par différents stimuli causés par l'interaction Eiger/Wengen mais également par la liaison d'autres ligands à leurs récepteurs comme PVF/PVFR (Platelet vascular factor/ PVF receptor) et Wingless/Frizzled (Figure 6) [84].

L'activation de la JNK Bsk induit l'activation de Jra (Jun-related antigen) par phosphorylation de différents résidus à son extrémité N-terminale. Jra est alors capable de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec Fra (Fos-related antigen), qui est codée par *kayak*. Jra et Fra constituent le facteur de transcription AP-1 (Adaptor Protein complex-1).

Bsk est activée par une cascade de kinases (Figure 6) qui diffère selon la spécificité de réponse médiée par la voie JNK. Dans tous les cas, Bsk est phosphorylée par la MAPK kinase (MAP2K) Hemipterous/Mkk7 (Hep) et par la MAP2K Mkk4/Mkk4 (MAP kinase kinase 4) dans certains mécanismes tels que la transduction du signal médié par l'activation de la voie Eiger/Wengen [85]. La cascade Hep>Bsk>Jra/Fra est considérée comme le cœur de la voie. Les MAP2K Hep et Mkk4 peuvent être activées par phosphorylation par les six MAPK Kinase kinase (MAP3K) de drosophile que sont : DASK1/ASK1 (Drosophila apoptosis signal-regulating kinase 1), TAK1/TAK (TGF- $\beta$ -activated kinase), TAK12/TAK (TAK1-like 2), Mekk1/Mekk1-4 (MAP/ERK kinase kinase), Slipper/ Mixed lineage kinase, Wallenda/ Dual leucine zipper-bearing kinase. Suivant les stimuli et les caractéristiques physiques des différentes MAP3K, celles-ci peuvent être activées soit par des petites GTPases telles que Rac1, Rho1 (Ras homologous 1) et Cdc42 (Cell division cycle 42), soit par la MAPK Kinase Kinase Kinase (MAP4K) Misshapen (Msn), un membre de la super famille des Sterile-20 Kinase, soit par des protéines adaptatrices telles les membres de la famille des TRAF (DTRAF1 et DTRAF2), qui sont, comme je l'ai détaillé précédemment, des protéines liées aux récepteurs membranaires. C'est la combinaison entre les différentes MAP2K, MAP3K, MAP4K et les protéines adaptatrices qui est responsable de la spécificité de réponse. Pour certains auteurs, ce serait le choix de la MAP3K qui contribuerait en grande partie à la spécificité du signal et qui aurait, par conséquent, un rôle primordial [86].

### **1.3.3.2. Activation de la voie JNK dans les mécanismes d'apoptose**

De nombreuses études ont permis d'établir la diversité des modes d'activation de la voie JNK et des mécanismes d'apoptose induits (Figure 7). Lors de la mort dépendante de l'activation de la voie Eiger/Wengen, des études génétiques basées sur la modulation du phénotype d'ablation des yeux causé par une surexpression de Eiger, ont permis de déterminer de façon assez précise comment la voie JNK est activée. DTRAF2, qui interagit directement avec Wengen [72, 85], serait responsable de l'activation de la voie JNK plutôt que DTRAF1 comme le suggéraient des études initiales [70, 85, 87]. En effet, l'inhibition de DTRAF1 ne semble pas avoir beaucoup d'effet sur le phénotype d'ablation des yeux. L'activation de DTRAF2 serait favorisée par dCYLD qui induit sa désubiquitinylation et le protège de sa dégradation [71].



**Figure 6 : La voie JNK.**

La voie JNK est impliquée dans un certain nombre de processus au cours du développement de la drosophile. En réponse à un stimulus spécifique (en rouge) des protéines adaptatrices, des petite GTPases ou la MAP4K Msn (en orange) activent une voire plusieurs MAP3K (en jaune). Ces dernières activent à leur tour par phosphorylation les MAP2K (en vert), ce qui aboutit à l'activation du facteur de transcription Jra par la JNK Bsk. La combinaison entre les différents éléments de cette voie serait déterminante pour la spécificité de réponse. Adapté de [89].

L'activation de DTRAF2 semble également être facilitée par l'ubiquitinylation médiée par l'ubiquitine ligase E2 composée de l'hétérodimère Ben-Duev1a [74, 88].

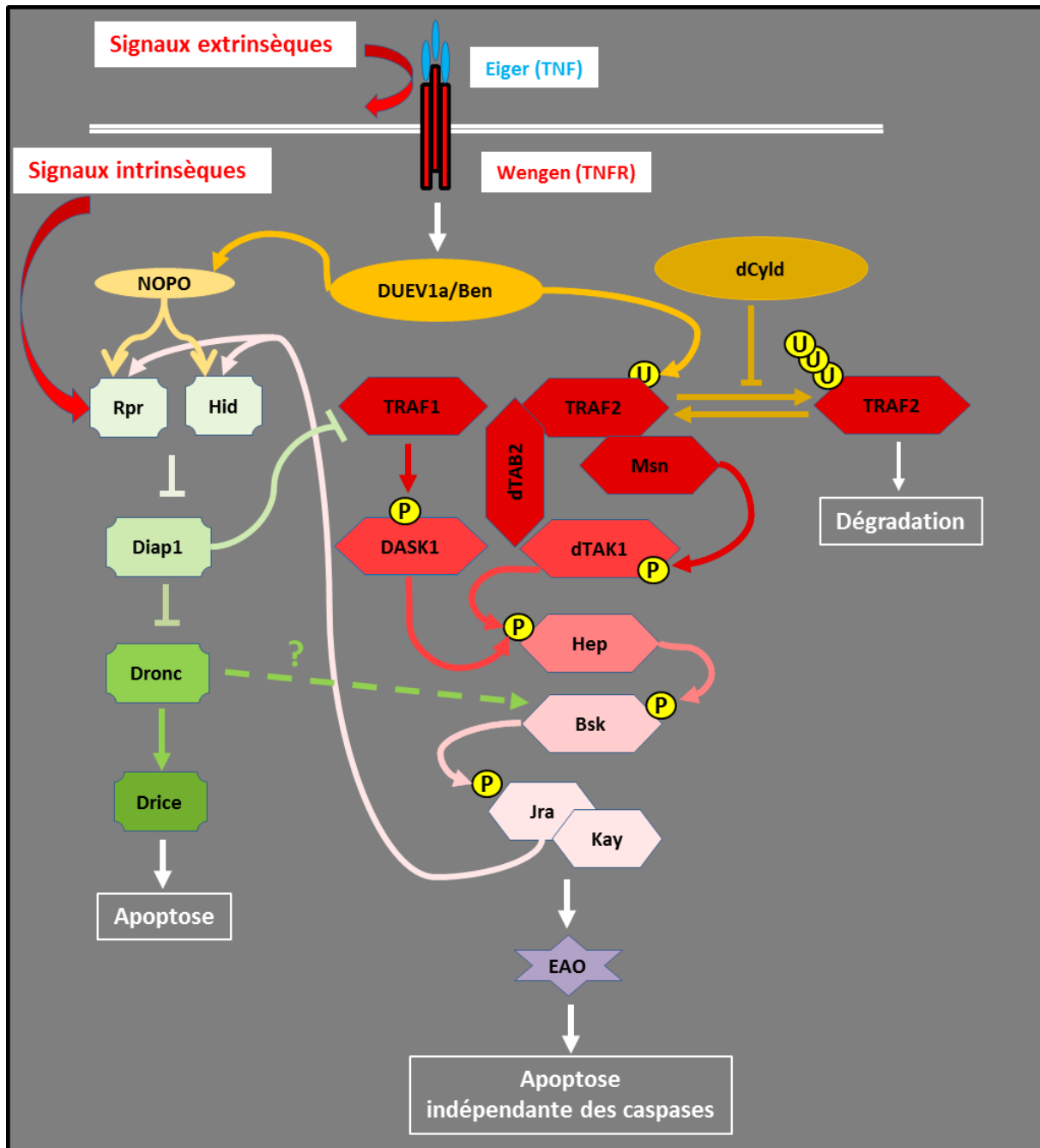
La formation d'un complexe entre DTRAF2, la protéine adaptatrice TAB2 et la MAP3K TAK1 permettrait l'activation de cette dernière par la MAP4K Misshapen [85]. Cette cascade de phosphorylation aboutirait à l'activation de la voie JNK.

Une voie JNK pro-apoptotique différente, constituée de DTRAF1-DASK1-Hep-Bsk, a été mise en évidence par une étude génétique, basée sur la modulation de phénotypes d'ablation des yeux dus à une surexpression de Rpr. Cette voie serait activée par la dégradation de DIAP1. En effet, DIAP1 serait capable d'inhiber l'activation de la voie JNK en adressant au protéasome la protéine adaptatrice DTRAF1 via son activité ubiquitine-ligase E3 [90].

La dégradation de DIAP1 pourrait également permettre l'activation de la caspase initiateur Dronc. En effet, une boucle d'amplification de l'expression des gènes *reaper* et *hid* dans laquelle Dronc active la voie JNK a été décrite. Ce mécanisme, induit par un stress génotoxique et dépendant de p53, renforcerait l'activation des caspases [91].

Si la régulation de DIAP1 semble être centrale dans l'induction de la mort cellulaire programmée chez la drosophile, il existe également des voies qui en sont indépendantes, telle la voie des pentoses phosphates qui module l'activation de Dronc par le NADPH [92].

Dans cette première partie, j'ai détaillé les principales voies que les cellules ont à leur disposition pour activer l'apoptose. Ces voies varient en fonction du tissu et de l'origine physiologique ou non physiologique du stress.



**Figure 7 : Activation et rôle de la voie JNK durant l'apoptose chez la drosophile.**

La voie JNK peut être activée par des signaux extrinsèques ou intrinsèques afin d'induire une apoptose dépendante ou indépendante des caspases. En effet, la voie JNK peut être activée par la transduction du signal du TNF par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase E2 formée de l'hétérodimère BEN-DUEV1A qui active la protéine TRAF2 par ubiquitinylation (U) engendrant une cascade de phosphorylation (P) aboutissant à l'induction d'une apoptose indépendante des caspases par l'induction d'espèces actives de l'oxygène (EAO). La voie JNK peut également être activée par la dégradation de DIAP1 via l'activation de TRAF1 en réponse à un stimulus intrinsèque. Dronc pourrait également induire l'activation de la voie JNK mais le mécanisme mis en jeu reste inconnu. L'activation de la voie JNK peut également provoquer une apoptose dépendante des caspases en favorisant la dégradation de DIAP1 via l'expression de *rpr* et de *hid*.

## **2. Réticulum endoplasmique et stress**

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé aux conséquences d'un stress du réticulum endoplasmique (RE). Je vais donc détailler, dans cette seconde partie, les voies de signalisation activées en réponse à ce type de stress ainsi que les relations existantes entre le stress du RE et les voies d'apoptose.

### **2.1. Le réticulum endoplasmique**

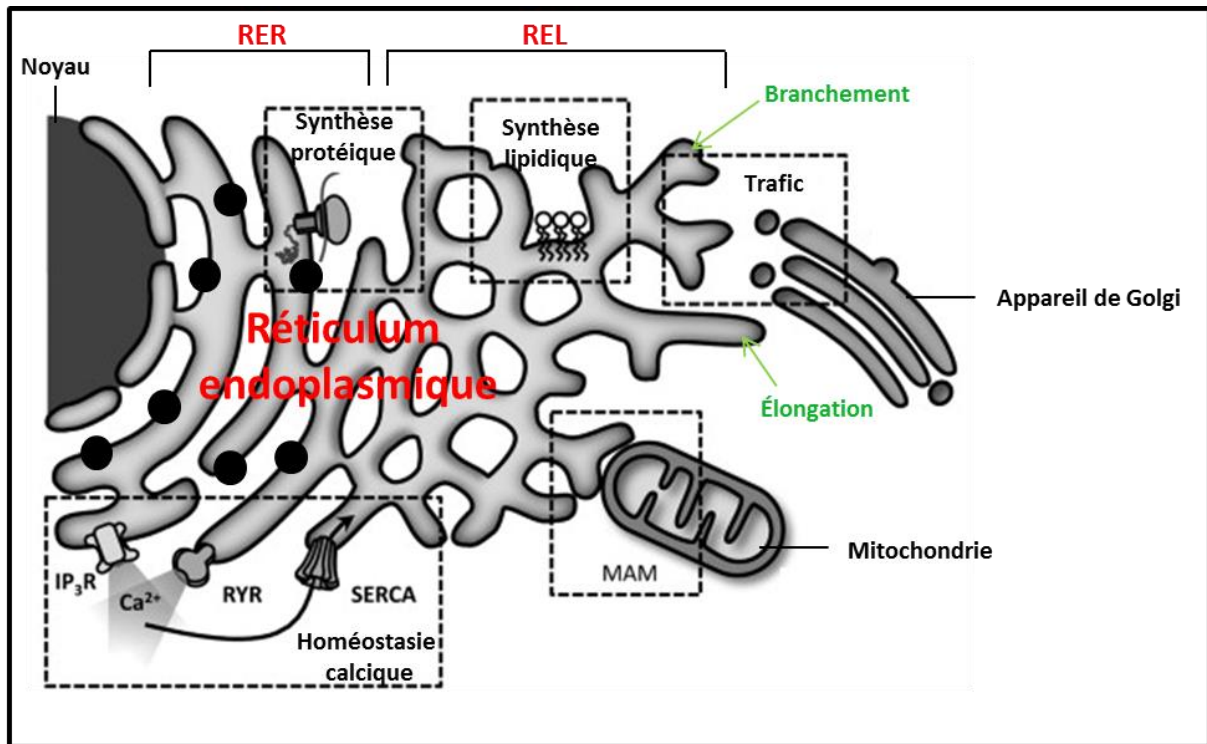
Le réticulum endoplasmique (RE), dont l'abondance dépend des besoins cellulaires, est impliqué dans différents processus cellulaires tels que la synthèse des lipides, la maturation des protéines sécrétées ou liées à la membrane plasmique et la régulation de la quantité de calcium cytosolique (Figure 8).

#### **2.1.1. La synthèse lipidique**

Le RE joue un rôle essentiel dans la synthèse des phospholipides, en particulier les glycérophospholipides et les sphingolipides, qui constituent les principaux composants des membranes biologiques. Il contient des enzymes qui permettent de transformer le glycérol et les acides gras en précurseurs des phospholipides. Ces derniers seront ensuite convertis en phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, *et cætera* [93]. Le RE participe également à la biosynthèse du cholestérol qui est, entre autres, un précurseur de différentes hormones stéroïdes comme l'ecdysone chez les arthropodes.

#### **2.1.2. L'homéostasie calcique**

Le calcium est l'un des seconds messagers les plus importants. En effet, il intervient dans différents processus cellulaires incluant la synthèse protéique, l'exocytose, la transcription, la prolifération, la contraction musculaire et l'apoptose [94]. Sa concentration doit donc être finement régulée. Le niveau basal des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme est maintenu à 100 nM



**Figure 8 : Structure et fonction du Réticulum endoplasmique.**

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organe dynamique constituant un environnement riche en oxygène et en calcium. Il est divisé en trois domaines : le RE en feuillet, le RE tubulaire et l'enveloppe nucléaire. Le premier est caractérisé par sa richesse en ribosomes, ce qui lui a valu le nom de réticulum endoplasmique rugueux (RER). Il est opposé au RE tubulaire qui contient peu de ribosomes (ronds noirs) et qui est communément appelé réticulum endoplasmique lisse (REL). RER et REL ne se différencient pas uniquement par la présence ou l'absence des ribosomes, mais également par leur localisation dans le cytoplasme. Ces deux formes de RE sont hautement dynamiques et interconvertibles. Il est à noter que peu de types cellulaires possèdent à proprement parler un REL. Les différentes fonctions du RE sont indiquées dans les cadres en pointillé noirs. D'après [95].



par de multiples transporteurs membranaires qui peuvent expulser les ions  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule ou favoriser leur stockage intracellulaire dans la lumière du RE et les mitochondries.

Dans le RE, cette concentration est maintenue entre 100 et 700  $\mu\text{M}$  [96]. Des modifications de cette dernière peuvent avoir des effets néfastes pour l'ensemble de la cellule. Elle est principalement régulée, d'une part, par les récepteurs IP3R (inositol 1,4,5-triphosphate receptor) et RyR (ryanodine receptor) qui favorisent la libération d'ions calcium dans le cytoplasme, et d'autre part, par la pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) qui permet l'import du calcium cytoplasmique vers la lumière du RE [94]. Des protéines chaperonnes contenues dans la lumière du RE permettent également de tamponner les ions calcium libres contenus dans cet organe.

#### **2.1.2.1. Les protéines tampons**

La calréticuline est l'une des principales protéines chaperonnes impliquées dans le bon repliement des protéines. Elle possède un domaine d'interaction avec le calcium qui lui permet de le tamponner dans la lumière du RE. D'autres protéines chaperonnes, impliquées dans la voie de biosynthèse des protéines, affectent également l'homéostasie calcique. Il s'agit de la calnécine, de BiP (Binding of immunoglobulin protein) également connue sous le nom de Grp78 (glucose-regulated protein 78), de Grp94, ainsi que des thiol oxydoréductases PDI (protein disulfide-isomerase) et de ERp72 [97].

#### **2.1.2.2. Les canaux calciques**

##### **2.1.2.2.1. SERCA**

Toutes les pompes SERCA partagent les mêmes propriétés générales : elles transportent deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  par molécule d'ATP hydrolysée, permettant ainsi le maintien de la concentration en calcium luminal [98]. Il existe chez les vertébrés 10 isoformes qui résultent d'un épissage alternatif dépendant des tissus de trois gènes paralogues. Par exemple, SERCA2a est présente dans les cellules musculaires tandis que SERCA3 est présente dans les cellules non musculaires. Les isoformes de SERCA possèdent des affinités différentes pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et pour des régulateurs de leur fonction, permettant ainsi des spécificités de réponse en

fonction des signaux cellulaires. Les invertébrés, eux, ne possèdent classiquement qu'un gène *serca* qui est l'orthologue de *serca2* des vertébrés

#### 2.1.2.2.2. IP3R

L'IP3R forme un complexe homotétramérique qui constitue un canal permettant la sortie des ions calcium de la lumière du RE vers le cytosol. Il existe trois isoformes d'IP3R (IP3R1-3) chez les mammifères tandis que la drosophile n'en possède qu'une. Ces isoformes sont très similaires (65% de similitude) mais elles diffèrent par leur distribution tissulaire et leur affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et leur ligand, l'IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate). Les combinaisons entre les différentes isoformes permettent de former des canaux fonctionnellement différents d'un tissu à l'autre [99]. Chaque monomère d'IP3R possède quatre sites de fixation pour l'IP3 cytoplasmique qui provoque l'ouverture du canal.

La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique intervient également, de façon indépendante de la quantité en IP3, dans la régulation de l'ouverture de ce canal. En effet, une faible concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique augmente la réponse à la fixation de l'IP3, tandis qu'une forte concentration l'inhibe. Il existe deux types de sites de fixation pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Le premier a une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et stimule l'ouverture du canal. Le second a une affinité réduite pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Il ne permet la liaison du calcium qu'en présence d'une forte concentration calcique, et cette fixation inhibe l'ouverture du canal [100].

L'ouverture du canal IP3R peut également être inhibée par une faible concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, indépendamment de la fixation d'IP3 et du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique interagissant avec l'IP3R [101]. A l'inverse, une forte quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal peut induire l'ouverture du canal [102].

#### 2.1.2.2.3. RyR

RyR est un complexe homotétramérique qui forme un canal permettant la sortie des ions calciums de la lumière du RE vers le cytosol. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de RyR (RyR1-3). RyR1 est présente essentiellement dans les muscles squelettiques, RyR2 est majoritairement retrouvée dans le myocarde tandis que RyR3 est surtout présente dans le cerveau. La drosophile possède une seule isoforme de RyR.

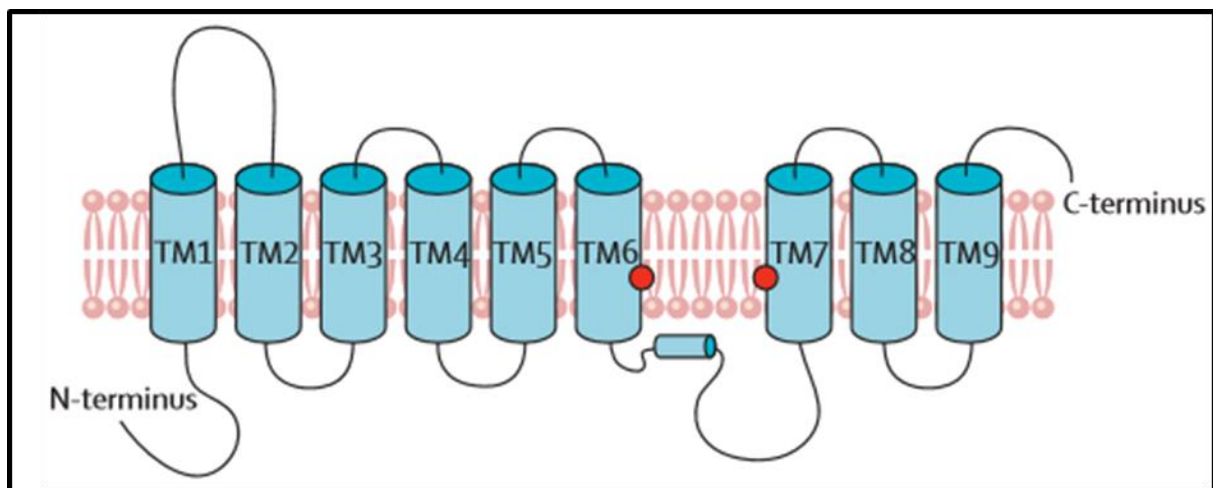
RyR porte deux sites de fixation pour le  $\text{Ca}^{2+}$  dans sa région cytoplasmique. L'un, de haute affinité, est responsable de l'activation et de l'ouverture du canal quand la concentration en calcium cytoplasmique est faible ; tandis que le second site, de faible affinité, est responsable de l'inactivation et de la fermeture du canal quand la concentration en calcium cytoplasmique devient trop importante. RyR peut également détecter la concentration en calcium luminal car il peut s'ouvrir spontanément si la concentration en calcium dans le RE devient trop importante [103].

### **2.1.2.3. La préséniline**

L'homéostasie calcique peut également être modulée de différentes manières par la préséniline. Chez les mammifères, il existe deux protéines connues sous le nom de PS1 (Presenilin 1) et PS2 (Presenilin 2) qui possèdent 67% de similitude de séquence protéique [104]. La distribution de PS1 et PS2 est ubiquitaire mais elles sont plus fortement présentes dans le cerveau [105]. 170 mutations de PS1 et 13 de PS2 ont été identifiées et associées à 40% des cas de la forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer [106]. Ces protéines sont conservées au cours de l'évolution car elles sont présentes chez la levure et chez la drosophile. Contrairement aux mammifères, il existe une protéine unique de drosophile qui est nommée Psn (Presenilin). Celle-ci possède 53% de similitude de séquence protéique avec les formes humaines [107].

La forme entière de PS1 et PS2, dont le poids moléculaire est 50 kDa, est appelée forme holoprotéique. Elle est présente essentiellement au niveau de la membrane du RE, mais elle peut également être retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi [108-110]. PS1 est une protéine transmembranaire constituée de 9 domaines transmembranaires et d'une région hydrophobe présente dans le cytosol entre les domaines transmembranaires 6 et 7 (Figure 9) [111]. Les résidus aspartiques en position 257 et 385 au niveau de ses domaines transmembranaires 6 et 7 participent à son activité catalytique [112].

Cette forme entière subit deux clivages endoprotéolitiques qui aboutissent à la formation des fragments N- et C- terminaux (NTF et CTF) mesurant respectivement 30 et 20 kDa qui seront, eux, majoritairement localisés au niveau de l'appareil de Golgi. Cette endoprotéolyse a lieu au niveau de la région hydrophobe présente dans le cytosol entre les domaines TM6 et TM7 [113]. L'endoprotéolyse de PS1 semble débiter au niveau de la méthionine 292, puis un second clivage a lieu après le résidu 298 pour donner les fragments NTF et CTF [114]. Le mécanisme est le même pour PS2. PS1 et PS2 régulent elles-mêmes ce clivage par leur site



**Figure 9 : Structure de la préséniline 1 de mammifère.**

La préséniline 1 est constituée de 9 domaines transmembranaires dont les domaines 6 et 7 qui possèdent les résidus aspartiques (points rouges) qui sont requis pour son activité catalytique  $\gamma$ -sécrétase. Adapté de [115].

catalytique situé au niveau des domaines transmembranaires TM6 et TM7 [116, 117]. Ces fragments restent associés et forment un hétérodimère NTF/CTF actif qui sera plus stable que la forme entière qui est rapidement polyubiquitinylée et dégradée par le protéasome, et donc généralement peu détectable au niveau du RE [113, 118].

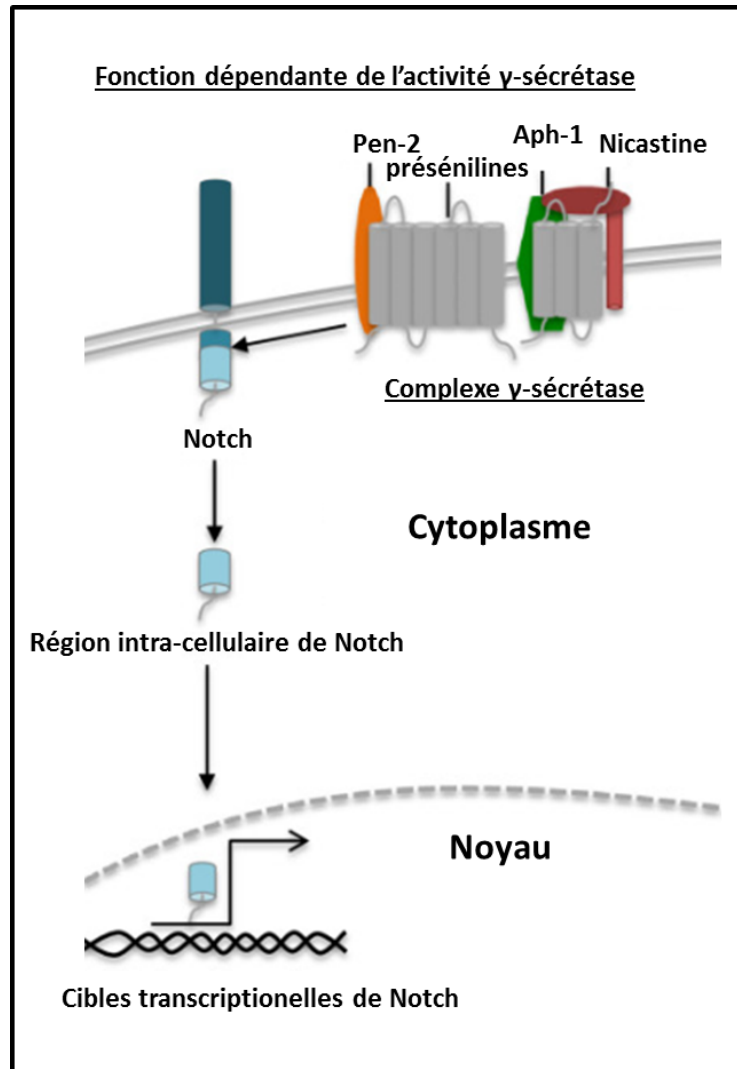
#### 2.1.2.3.1. La $\gamma$ -sécrétase

##### 2.1.2.3.1.1. *Activation de la $\gamma$ -sécrétase*

L'hétérodimère CTF/NTF de PS1 ou PS2 interagit avec la nicastrine, Aph-1 (Anterior pharynx defective-1), PEN-2 (Presenilin ENhancer-2) pour former un complexe possédant une activité  $\gamma$ -sécrétase qui induit le clivage intramembranaire de différentes protéines transmembranaires (Figure 10) [112]. Ce complexe est également présent chez la drosophile. L'expression des différents membres de ce complexe est suffisante pour induire la formation d'un complexe actif [119]. La préséniline contient les deux résidus aspartiques qui sont essentiels à l'activité protéase du complexe [120], tandis que les autres protéines contribuent à sa maturation et à sa stabilisation. En effet, Aph-1 favoriserait la stabilité de la forme holoprotéique, alors que la nicastrine favoriserait la formation d'un complexe intermédiaire stable [119]. PEN-2 serait impliquée dans la stabilité des fragments CTF et NTF car son inhibition aboutit à leur dégradation par le protéasome chez les mammifères et la drosophile [121, 122]. PEN-2 favorise donc la formation d'un complexe actif stable [123]. La formation de ce complexe serait initiée au niveau du RE. En effet, il est retrouvé dans des vésicules de transport COPII (Coat Protein complex II) qui interviennent dans le transport entre le RE et le compartiment intermédiaire RE/Golgi. Son activation par l'endoprotéolyse de la préséniline aurait lieu dans un compartiment plus acide tel que le Golgi [10]. Une fois activé, ce complexe migre alors au niveau de la membrane plasmique où il joue son rôle de  $\gamma$ -sécrétase.

##### 2.1.2.3.1.2. *Activité de la $\gamma$ -sécrétase*

Ce complexe  $\gamma$ -sécrétase possède plus de 60 cibles chez les mammifères dont APP ( $\beta$ -amyloid precursor protein), qui n'a pas d'homologue chez la drosophile, et Notch (Figure 10). Ces deux protéines sont impliquées dans le déclenchement de la maladie d'Alzheimer.



**Figure 10 : Fonction du complexe  $\gamma$ -sécrétase.**

Le complexe  $\gamma$ -sécrétase est composé de la nicastrine, APh-1 (Anterior pharynx Defective 1), PEN-2 (Presenilin Enhancer-2) et de la préséniline qui possède l'activité  $\gamma$ -sécrétase. Notch est une protéine transmembranaire. La liaison d'un de ses ligands Delta ou Serrate induit un clivage au niveau de sa région extracellulaire. Le fragment transmembranaire résultant est clivé par la  $\gamma$ -sécrétase, libérant ainsi la région cytosolique qui est alors transloquée au noyau où elle jouera son rôle de facteur de transcription. Adapté de [124].

Il est à noter que la surexpression de la forme entière de la protéine PS1 n'induit pas de modification de la quantité de fragment CTF et NTF [9, 113] mais qu'elle est caractérisée par une accumulation de la forme holoprotéique. Un stress du RE induit par un traitement à la tunicamycine -un inhibiteur de la N-glycosylation- en cellules de rein embryonnaire humain, provoque le même phénotype [125]. De plus, cette accumulation de la forme holoprotéique ne semble pas corrélée à une augmentation de l'activité  $\gamma$ -sécrétase car cette surexpression n'affecte pas la production des peptides amyloïdes  $\beta$  [9]. La nicastrine, APH-1 et PEN-2 semblent donc être les facteurs limitant la formation de ce complexe [126].

#### 2.1.2.3.2. Fonction indépendante de l'activité $\gamma$ -sécrétase

La préséniline possède également des fonctions indépendantes de son activité  $\gamma$ -sécrétase. L'une d'entre elles est la régulation de l'homéostasie calcique. En effet, la préséniline, contrôle 80% de l'activité de sortie du calcium luminal dans des fibroblastes embryonnaires de souris [127]. Par ailleurs, des mutations ponctuelles de PS1 et de PS2 induisent une augmentation du calcium luminal dans l'hippocampe [128] tout comme dans les lymphoblastes humains [129] mais pas dans les neurones striés. Ce phénotype contribuerait au développement de la maladie d'Alzheimer [130-133]. Ces mutations n'affectent pas les sites catalytiques suggérant que cette fonction de régulation de l'homéostasie calcique est indépendante de l'activité  $\gamma$ -sécrétase [127, 134, 135]. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la régulation du flux calcique par la préséniline. Un premier mécanisme serait que la forme holoprotéique de la préséniline est capable de fonctionner comme un canal de fuite passive des ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

##### 2.1.2.3.2.1. *La préséniline : un canal de fuite des ions calciques*

Un premier mécanisme serait que la forme holoprotéique de la préséniline est capable de fonctionner comme un canal de fuite passive des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette fonction dépendrait des domaines transmembranaires TM6, TM7 et TM9 qui pourraient former un canal de conductance des ions calciques de par leur caractère hydrophile [127]. En effet, des mutants de différents résidus de ces domaines abrogent la capacité de PS1 à favoriser la sortie des ions calciques [136]. Cependant une étude récente semble démontrer que la préséniline ne

formerait pas des canaux calciques au niveau de la membrane du RE et qu'elle régulerait la concentration calcique intracellulaire indépendamment de ce compartiment [137]. La différence entre ces différentes études pourrait résider dans l'utilisation de lignées cellulaires et de techniques de mesure du calcium différentes.

#### *2.1.2.3.2.2. La préséniline : un modulateur d'activité des canaux calciques*

La préséniline pourrait également réguler l'homéostasie calcique en modulant l'activité de la pompe SERCA. En effet, des études ont mis en évidence que PS1 et PS2 régulent, par interaction directe, l'activité normale de SERCA [138]. Lors d'un stress du RE, cette interaction entre SERCA et la forme holoprotéique de la préséniline est facilitée par l'accumulation de cette forme au niveau de la membrane du RE. L'augmentation de cette interaction permet une résistance accrue au stress du RE en favorisant le maintien de l'homéostasie calcique [125].

Les présénilines PS1 et PS2 sont également capables d'interagir directement avec la RyR principalement trouvée dans le cerveau, RyR2. Cette interaction augmente la probabilité et l'amplitude d'ouverture du canal RyR2 sans interférer avec son domaine de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  [139-141].

L'effet de PS1 et PS2 sur l'homéostasie calcique peut également être expliqué par une modulation de l'activité d'IP3R. En effet, l'expression en cellules d'insecte et de poulet de la forme holoprotéique de PS1 ou de PS2 augmente la durée d'ouverture d'IP3R en réponse à la fixation d'IP3. L'expression des formes mutantes de PS1 et PS2 associées à la maladie d'Alzheimer augmente la durée et la probabilité d'ouverture de ce canal calcique. IP3R étant capable d'interagir avec PS1 et PS2 au sein du même complexe [142], cette interaction favorise donc la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  luminal dans le cytosol. Elle a également été mise en évidence chez des patients et des souris modèles de la maladie d'Alzheimer [143]. En conclusion, la préséniline joue donc un rôle important dans l'homéostasie calcique au niveau du RE.

### **2.1.3. La synthèse protéique**

#### **2.1.3.1. Translocation/modifications post-traductionnelles**

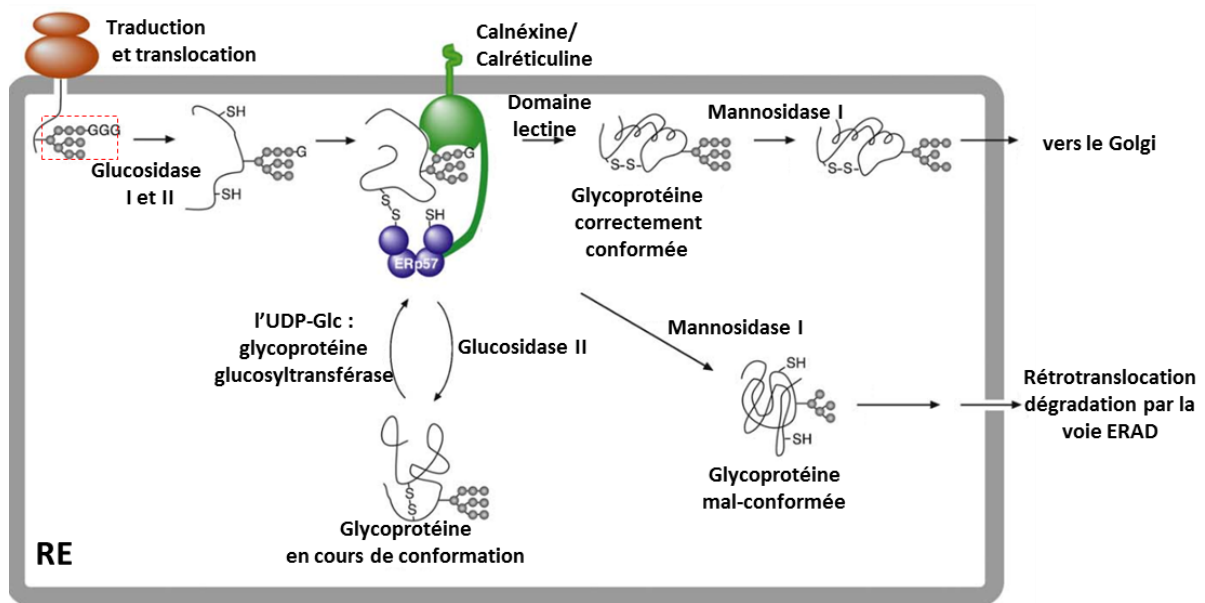


Les protéines destinées à la sécrétion, à l'appareil de Golgi, au RE, aux lysosomes ou à la membrane plasmique sont le plus souvent incorporées dans le RE durant leur élongation (Figure 11). En effet, ces polypeptides naissants possèdent à leur extrémité N-terminale un signal d'adressage au RE qui est composé d'acides aminés hydrophobes. Cette séquence est reconnue par la SRP (Signal Recognition Particule) qui est constituée de 6 polypeptides couplés à un petit ARN. Les SRP cyclent entre le cytoplasme et la membrane du RE. Quand elle se lie à l'un de ces signaux, la traduction du messenger est transitoirement bloquée. Le complexe formé par la SRP couplée au ribosome est transloqué vers la membrane du RE où il se lie à un récepteur reconnaissant la SRP [144]. Ce récepteur est lui-même lié au translocon, un canal qui permet la translocation des protéines naissantes dans la lumière ou dans la membrane du RE. L'interaction entre le ribosome et le translocon permet ainsi au polypeptide en cours d'élongation de traverser la membrane du RE. Des modifications post-traductionnelles nécessaires à l'acquisition de la conformation native la plus stable ont ensuite lieu au niveau de la lumière du RE. La modification la plus fréquente est une glycosylation caractérisée par l'ajout d'un polysaccharide  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  qui sera ensuite modifié en  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  par suppression de deux glucoses par des glucosidases. En effet, 80% des protéines passant par le RE sont N-glycosylées sur un résidu aspartique. D'autres modifications post-traductionnelles, telles l'ajout de lipides et la formation de ponts disulfures, contribuent également à l'acquisition de la conformation finale des protéines [145].

#### **2.1.3.2. Le cycle calnexine/calréticuline**

Dans le RE, les protéines naissantes non-conformées interagissent avec différentes protéines chaperonnes ou enzymes afin d'acquérir leur conformation finale. On retrouve, parmi ces protéines, BiP/Grp78, Grp94, la calnexine, la calréticuline ainsi que les thiol oxydoréductases PDI et ERp57. BiP/Grp78 et Grp94 ont la capacité de reconnaître les régions hydrophobes exposées des protéines naissantes. PDI, ERO $\alpha$  (ER oxydase  $\alpha$ ) et ERp57, quant à eux, utilisent l'oxygène contenu dans le RE pour former des ponts disulfures qui stabilisent l'assemblage et la conformation protéique [146].

Il existe au sein du RE un système de contrôle du bon repliement des protéines. Ce système est connu sous le nom de cycle Calnéxine (Cln)/Calréticuline (Crt). La Crt est soluble dans la



**Figure 11 : Le cycle Calnexine/ Calréticuline.**

Le cycle Calnexine/Calréticuline permet aux protéines d'acquérir leur conformation la plus stable. Les modifications subies par l'oligosaccharide  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  (encadré en rouge) présent au niveau des protéines naissantes servent de signal pour les différentes étapes du cycle. Lorsque les protéines sont correctement conformées, elles sont dirigées vers l'appareil de Golgi. Dans le cas inverse, elles sont dirigées vers le protéasome via la voie ERAD. G=glucose; sphères grise= mannose. D'après [147].

lumière du RE tandis que la Cln est ancrée dans la membrane du RE. Ces deux protéines présentent un fort degré de similarité structurelle et fonctionnelle [148]. Elles sont capables de se lier avec l'oligosaccharide  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  présent sur les protéines naissantes *via* leur domaine lectine (Figure 11). Cette interaction induit un changement de conformation des protéines Cln/Crt qui permet le recrutement d'ERp57. Ce complexe peut désormais former des ponts disulfures favorisant ainsi le bon repliement des protéines. L'interaction entre Cln/Crt et des protéines mal ou non conformées libres dans le RE permet de les isoler et de les piéger, diminuant ainsi la probabilité d'agrégation de ces protéines. En effet, la concentration de protéines dans le RE étant élevée, le risque d'agrégation protéique dans ce compartiment cellulaire est accru [147].

Des cycles de libération des glycoprotéines sont régulés par la glucosidase II et l'UDP-Glc : glycoprotéine glucosyltransférase qui, respectivement, en enlevant ou en rajoutant le glucose terminal, annihilent ou favorisent l'interaction avec les protéines Cln/Crt (Figure 11). Lorsque la protéine naissante est correctement conformée, la mannosidase I enlève un mannose, ce qui sert de signal pour une prise en charge par les vésicules de transport et l'envoi vers l'appareil de Golgi. Dans le cas où la protéine est toujours mal conformée, la re-glycosylation médiée par l'UDP-Glc glycoprotéine glucosyltransférase favorise une nouvelle interaction avec la Cln/Crt, ce qui laisse le temps à la protéine de se replier de façon optimale. Les protéines, qui n'adoptent pas une conformation correcte après les cycles de glycosylation/déglycosylation sont dirigées vers la voie ERAD (ER-Associated Degradation) après avoir subi le retrait de plusieurs mannoses. La voie ERAD induira leur dégradation via le protéasome [147].

L'activité de ces protéines chaperonnes peut être modulée par la concentration en calcium dans le RE. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans la lumière est capable d'interagir avec ces différentes protéines. Cette interaction module leur conformation [149] et permet leur liaison à l'oligosaccharide  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  [150]. L'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque donc une accumulation de protéines mal conformées aboutissant à un stress du RE.

## **2.2.Stress du RE et pathologie**

Le stress du RE peut être causé par différents changements physiologiques affectant la maturation des protéines dans cet organite. En effet, des perturbations de l'homéostasie calcique, du statut redox, une expression trop élevée de protéines empruntant la voie de sécrétion, une déplétion en glucose, des altérations de la glycosylation peuvent aboutir à une

accumulation de protéines non ou mal-conformées [1] qui s'agrègent et interfèrent avec le fonctionnement normal du RE, ce qui conduit à un stress du RE.

Un stress du RE a été mis en évidence dans différentes pathologies telles que l'athérosclérose, l'obésité, les désordres bipolaires, l'inflammation du système nerveux central, l'ischémie, l'hypertrophie cardiaque, les hépatites alcooliques, les maladies rénales et dans un certain nombre de cancers, les maladies auto-immunes, l'arthrite rhumatoïde, ainsi que dans l'amincissement du cartilage observé lors de l'arthrose [2-5]. Un stress du RE est également retrouvé dans le diabète de type II qui est caractérisé par une résistance à l'insuline. Il est causé par une production trop importante d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Un stress chronique du RE a également été mis en évidence dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington ou de Machado-Joseph [6, 7]. Ces dernières sont caractérisées par une accumulation de protéines mal-conformées et de protéines agrégées dans le cytoplasme et dans le RE [151]. Cette agrégation de protéines serait causée, entre autres, par des dysfonctionnements de la voie ERAD. Par exemple, la Parkin, qui est responsable de la maladie de Parkinson, est une ubiquitine ligase impliquée dans la voie ERAD [152]. Dans la maladie de Machado-Joseph, des agrégats protéiques inhibent le fonctionnement du protéasome qui est le composant terminal de la voie ERAD [151].

### **2.2.1. L'UPR**

Une réponse adaptative, appelée UPR (Unfolded Protein Response), est activée en cas de stress du RE afin de rétablir l'homéostasie du RE. En cas d'un stress prolongé du RE, de cytoprotectrice, elle devient pro-apoptotique. La majorité des recherches concernant cette réponse a été essentiellement menée chez les organismes modèles mammifères et levure, et plus récemment chez la drosophile [1, 153].

L'UPR est constituée de trois principales branches qui opèrent en parallèle et utilisent des mécanismes de transductions du signal qui leurs sont propres. Elles sont nommées d'après leur senseur de stress présent au niveau de la membrane du RE : la branche IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1), la branche PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase) et la branche ATF6 (Activating Transcription Factor 6) [154].

### 2.2.1.1. Les différentes branches de l'UPR

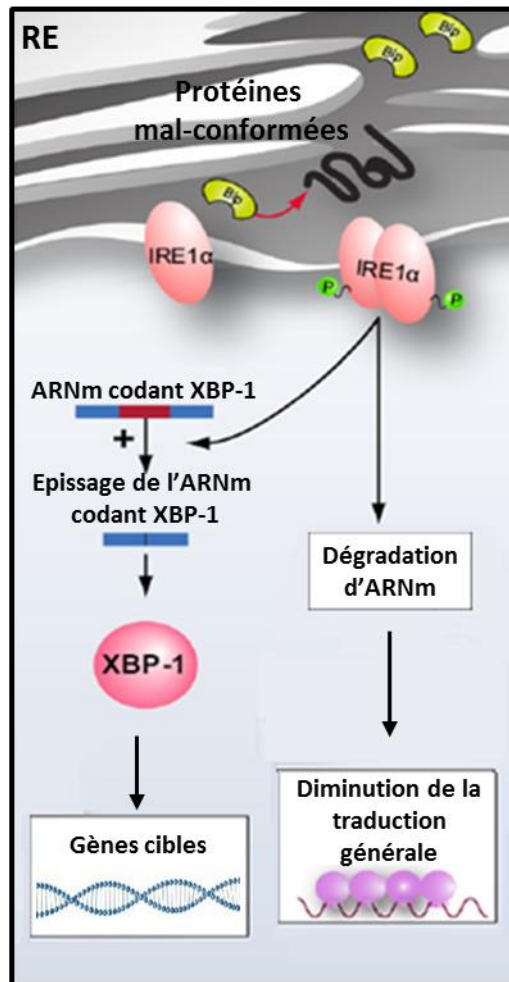
#### 2.2.1.1.1. La branche IRE1

La branche IRE1 (Figure 12) est la plus étudiée jusqu'à présent et la plus conservée car c'est la seule branche de l'UPR présente chez la levure [155]. Chez la drosophile, tout comme chez les mammifères, cette voie semble essentielle à l'UPR [156]. Il existe un seul homologue de drosophile du gène de levure *Irep*, appelé *Ire1* et deux chez les mammifères, *IRE1α* et *IRE1β*. *IRE1β* n'est exprimé qu'au niveau de l'intestin tandis qu'*IRE1α* est ubiquitaire.

Les produits de ces gènes sont des protéines transmembranaires présentant un domaine luminal de dimérisation et une activité kinase et endoribonucléase du côté cytoplasmique. Un stress du RE induit l'oligomérisation des IRE1. Cette oligomérisation déclenche une modification de conformation qui aboutit à l'activation de son activité endoribonucléase [157] par son domaine kinase après transphosphorylation [158]. Cette activité est renforcée par le regroupement des IRE1 au niveau de la membrane du RE [159].

Quand elle est activée, IRE1 catalyse l'épissage non-conventionnel d'un petit ARNm codant le facteur de transcription XBP1 (X-Box binding Protein 1) dans le cytosol [160, 161]. Cet épissage permet d'éliminer un intron constitué de 23 à 26 nucléotides suivant les espèces et la synthèse d'une forme active du facteur de transcription XBP1, qui contient un signal de localisation nucléaire, un domaine d'activation transcriptionnelle ainsi qu'un domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN b-ZIP (basic-leucine zipper motif). Une cible transcriptionnelle de XBP1 est le gène codant la kinase IRAK2 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-2). Cette dernière augmente l'épissage de XBP1, potentiellement en servant d'adaptateur entre IRE1 et XBP1. Cette boucle d'amplification de l'activation de la branche IRE1 est conservée chez la drosophile où elle implique *tube*, l'homologue d'*IRAK2* [162].

Contrairement aux observations faites chez la levure, XBP1 n'est pas l'unique cible d'IRE1 chez les métazoaires. Il a ainsi été montré en cellules S2 de drosophile [163] et en cellules de mammifère [164] qu'IRE1 inhibe l'expression de certains gènes indépendamment de XBP1 en clivant directement des ARNm associés à la membrane du RE [165]. Ceci permet de soulager le RE en diminuant la quantité de protéines y étant adressées. IRE1 réduit également la traduction générale en clivant l'ARN ribosomale 28S [166].



**Figure 12 : La voie IRE1 de l'UPR.**

La voie IRE1 de l'UPR est activée par dimérisation en réponse à une accumulation de protéines mal-conformées dans le RE. L'activité endoribonucléase acquise suite à cette dimérisation permet un épissage non conventionnel, dans le cytosol, de l'ARNm codant XBP1. Une fois synthétisée, XBP1 active l'expression de gènes qui tendent à diminuer le stress du RE. En parallèle, IRE1 favorise également la dégradation d'ARNm codant des protéines normalement dirigées vers la voie de sécrétion ce qui soulage également le RE. Ces deux fonctions d'IRE1 contribuent ainsi à un retour à l'homéostasie du RE. Adapté de [4].

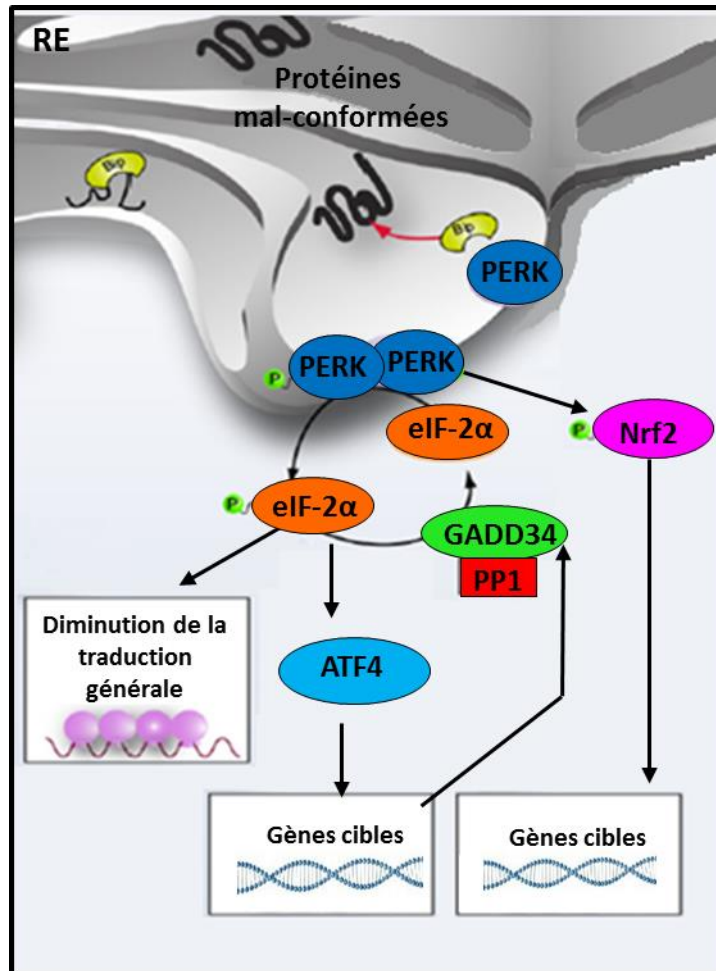
La forme entière d'XBP1, qui résulte d'un ARNm n'ayant pas subi cet épissage non-conventionnel dans le cytosol, est impliquée dans le rétrocontrôle positif de l'activation de XBP1 chez les mammifères. En effet, cette forme favorise l'adressage de l'ARNm codant XBP1 à la membrane du RE, facilitant ainsi son épissage par IRE1 [167]. Elle peut également réguler le rétrocontrôle négatif de cette branche de l'UPR. En effet, cette forme d'XBP1 peut piéger la forme épissée hors du noyau. Le complexe composé des deux formes de XBP1 est alors rapidement dégradé par le protéasome grâce au motif d'adressage au protéasome porté par la forme non épissée [168].

#### 2.2.1.1.2. La branche PERK

La protéine PERK, également appelée PEK (Pancreatic eIF2 $\alpha$  Kinase), est codée, chez les mammifères et la drosophile, par un gène unique dont l'expression est ubiquitaire. Cette protéine transmembranaire possède une activité kinase dans sa région cytosolique. Quand un stress du RE est détecté, PERK s'oligomériserise et s'autophosphoryle au niveau de sa région cytosolique (Figure 13). Cette autophosphorylation initie la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation Initiation Factor 2 $\alpha$ ), entraînant une inactivation du complexe eIF2 auquel il appartient, inhibant ainsi la traduction générale (Figure 14). Cette réduction de la traduction générale soulage le RE en diminuant le flux de protéines susceptibles d'entrer dans cet organelle [169]. L'action de PERK n'est pas seulement dépendante de son effet sur la traduction, car la sensibilité accrue à un stress du RE de cellules *perk*<sup>-</sup>/*perk*<sup>-</sup> n'est que partiellement sauvée par une inhibition de la traduction [170] mettant en évidence la présence d'autres mécanismes régulés par la voie PERK.

En parallèle à cette inhibition de la traduction générale, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  active la traduction spécifique de certains ARNm. Ces derniers contiennent de nombreuses et courtes phases ouvertes de lecture, dans leur région 5'UTR (Untranslated Region), qui précèdent la séquence codante fonctionnelle (Figure 15) [171]. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit ainsi la synthèse du facteur de transcription à domaine b-ZIP, ATF4 (Activating Transcription Factor 4) [169], mais également d'un transporteur de l'arginine et de la lysine acide nommé Cat-1 (Cationic amino acid transporter-1) [172].

Cependant, des études menées en cellules de mammifères ont permis de mettre en évidence que plus de la moitié des gènes régulés par l'activation de PERK sont indépendants de l'activation de ATF4, laissant supposer l'existence d'autres effecteurs en aval de PERK [173].



**Figure 13 : La voie PERK de l'UPR.**

La voie PERK de l'UPR est activée par une accumulation de protéines mal-conformées dans le RE. La dimérisation de PERK active son activité kinase cytosolique qui induit par phosphorylation d'eIF-2 $\alpha$  une diminution de la traduction générale, réduisant ainsi la quantité de protéines mal-conformées au niveau du RE. eIF-2 $\alpha$  phosphorylée induit l'expression du gène codant le facteur de transcription tels qu'ATF4. En parallèle, PERK promeut également l'activation du facteur de transcription Nrf2 par phosphorylation. ATF4 et Nrf2 régulent l'expression de gènes favorisant la diminution du stress du réticulum. Lorsque ce stress est résolu, l'expression de *Gadd34* permet le retour à un état traductionnel physiologique. Adapté de [4].



En effet, PERK peut phosphoryler et ainsi activer le facteur de transcription NRF2 (Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2) qui régule la réponse au stress oxydatif [174].

La voie PERK est modulée par un rétro-contrôle négatif. En effet, l'activation d'ATF4 induit l'expression du gène GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 34), par l'intermédiaire du facteur de transcription ATF3 [175]. GADD34 induit la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$  en activant le complexe PP1 (Protein Phosphatase 1) [176], permettant ainsi la reprise de la traduction générale et l'inhibition de la synthèse d'ATF4 [177].

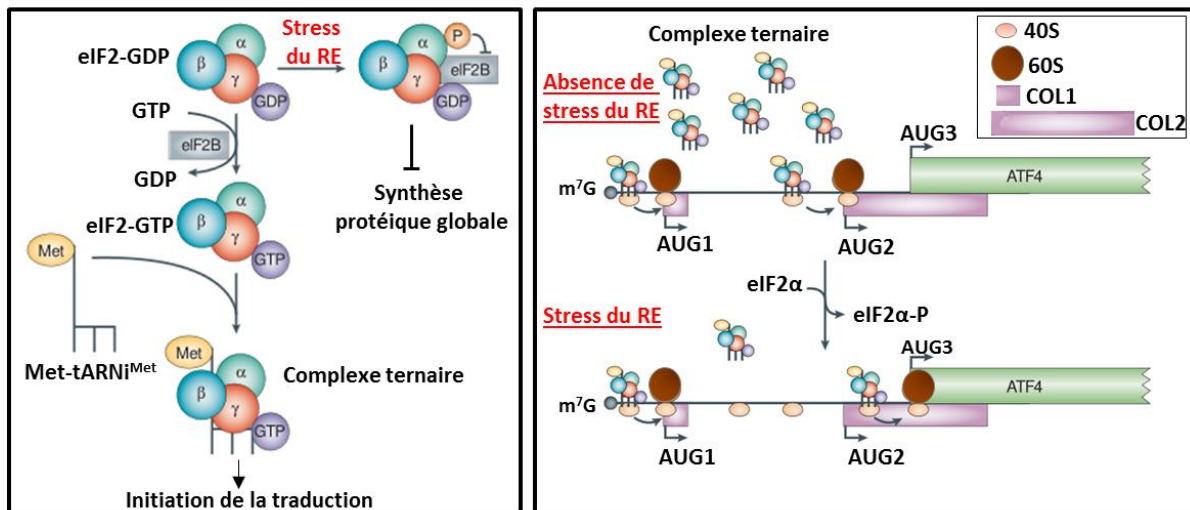
Chez la drosophile, le rôle précis de la voie PERK dans l'UPR n'a jamais été vraiment étudié *in vivo*. Les caractéristiques de PERK, décrites précédemment, semblent être conservées [154, 178] car l'homologue de drosophile de PERK est également capable de s'oligomériser et de phosphoryler eIF2 $\alpha$  [178, 179], et ATF4 a un homologue nommé Cryptocephal [180].

#### 2.2.1.1.3.

#### La branche ATF6

Les facteurs de transcription à domaine b-ZIP, ATF6, qui sont insérés dans la membrane du RE, sont codés, chez les mammifères, par deux gènes *ATF6 $\alpha$*  et *ATF6 $\beta$*  dont l'expression est ubiquitaire [181]. Il n'existe qu'un seul gène codant un orthologue d'ATF6 chez la drosophile et le planaire. De manière intéressante, il ne semble pas être impliqué dans l'UPR chez ces deux organismes modèles [182, 183]. Chez les mammifères, la détection d'un stress du RE par ATF6 met en évidence deux signaux de localisation à l'appareil de Golgi au niveau de son domaine luminal (Figure 16) [184]. ATF6 interagit alors directement avec les protéines sec23 et sec24 qui sont recrutées pour former les vésicules à manteau COPII, ce qui permet son transport antérograde du RE vers l'appareil de Golgi [185]. Au niveau de cet organite, ATF6 subit deux clivages protéolytiques médiés par deux enzymes nommées S1P (Site-1 Protease) et S2P (Site-2 Protease). La région cytosolique N-terminale, contenant le domaine b-ZIP et le domaine activateur de la transcription, est alors libérée et migre au noyau pour induire l'activation de la transcription de gènes cibles de l'UPR [186].

Ces trois branches ne sont pas les seules à promouvoir l'UPR. En effet d'autres senseurs du stress du RE ont été mis en évidence dans certains types cellulaires. C'est le cas d'OASIS, CREB4, CREB-H, Luman qui font partie de la famille des facteurs de transcription à domaine b-ZIP ressemblant à ATF6. Tout comme ATF6, leur activation par la détection du stress du RE induit leur relocalisation au niveau de l'appareil de Golgi où ils subissent un clivage permettant la libération de la région contenant leur domaine d'activation de la transcription, ce qui leur permet d'induire l'expression de gènes cibles de l'UPR.



**Figure 14 (à gauche): Inhibition de la synthèse protéique globale par la phosphorylation d'eIF2α.**

Le complexe eIF2 qui est composé des sous-unités eIF2α, γ, et β est actif quand il est lié au GTP. Le facteur d'échange eIF2B catalyse l'échange du GDP en GTP sur eIF2. Cette activation favorise son interaction avec l'ARNt portant une méthionine formant ainsi un complexe ternaire qui participe à l'initiation de la traduction. En condition de stress, la phosphorylation d'eIF2α inhibe l'échange GDP-GTP en empêchant la dissociation d'eIF2B. L'initiation de la traduction ne peut donc plus être réalisée, ce qui aboutit à une diminution de la traduction globale. Adapté de [187].

**Figure 15 (à droite) : Régulation traductionnelle de l'ARNm codant ATF4.**

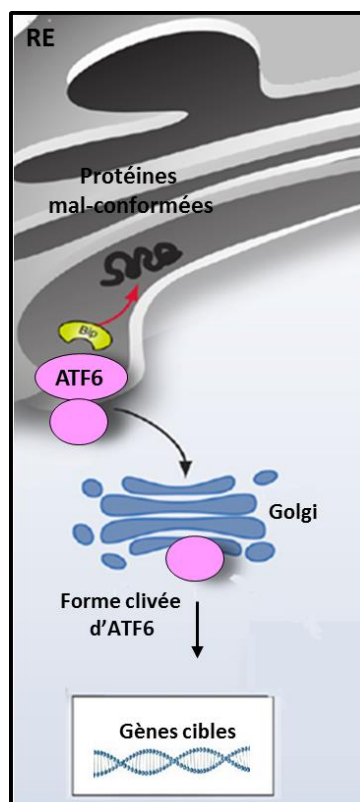
La traduction de l'ARNm codant ATF4 est contrôlée par deux cadres ouverts de lecture (COL) qui sont localisés au niveau de sa région 5' non traduite. En absence de stress du RE (en haut), la concentration du complexe ternaire eIF2-ARNt Met est élevée car le niveau d'eIF2α phosphorylé est faible. L'association de ce complexe, entre autres, avec la petite sous-unité ribosomale 40S forme le pré-complexe d'initiation qui scanne l'ARNm de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' jusqu'à l'identification d'un codon d'initiation (AUG). La grande sous-unité ribosomique 60S est alors recrutée pour initier la traduction. Le complexe ternaire associé à la petite sous-unité ribosomale 40S reconnaît en premier le codon d'initiation du COL le plus proximal sur l'ARNm codant ATF4 (COL1) et initie sa traduction. La réactivation du complexe ternaire permet de réinitialiser la traduction au niveau du COL suivant (COL2). La traduction de ce dernier inhibe celle d'ATF4 car COL2 chevauche celui d'ATF4. En condition de stress du RE (en bas), l'activation de la branche PERK induit la phosphorylation d'eIF2α entraînant une diminution de la concentration en eIF2 actif. Dans ce cas, après que COL1 soit traduite, la sous-unité 40S qui continue à scanner l'ARNm ne peut pas être rapidement rechargée en complexe ternaire actif. Bien qu'elle identifie l'AUG2, la traduction ne peut être initiée. Elle continue alors à scanner l'ARNm vers l'extrémité 3'. L'espace existant entre l'AUG2 du COL2 et le codon d'initiation d'ATF4 (AUG3) est suffisant pour permettre la réactivation du complexe ternaire avant que l'AUG3 ne soit identifié. Le COL codant ATF4 est alors traduit. D'après [187].

### **2.2.1.2. Détection des protéines mal conformées par les différents senseurs**

Différents modèles ont été proposés pour expliquer comment la région luminale des différents senseurs de l'UPR détecterait l'accumulation de protéines mal-conformées dans le RE. Le modèle initial est basé sur le fait que, dans des conditions d'homéostasie du RE, la région luminale de ces protéines interagit avec la protéine chaperonne BiP, Hsc70-3 (Heat shock cognate protein of 70-kDa 3) chez la drosophile, qui les maintiendrait sous un état inactif (Figure 17). Lorsqu'un stress du RE est induit, BiP interagirait préférentiellement avec les protéines mal-conformées, ce qui diminuerait la quantité de BiP disponible pour interagir avec les protéines ATF6, PERK et IRE1. Ceci aboutirait à leur activation en favorisant l'oligomérisation d'IRE1 et de PERK [182], ainsi que la mise en évidence des signaux de localisation à l'appareil de Golgi présents au niveau du domaine luminal d'ATF6 [182, 188].

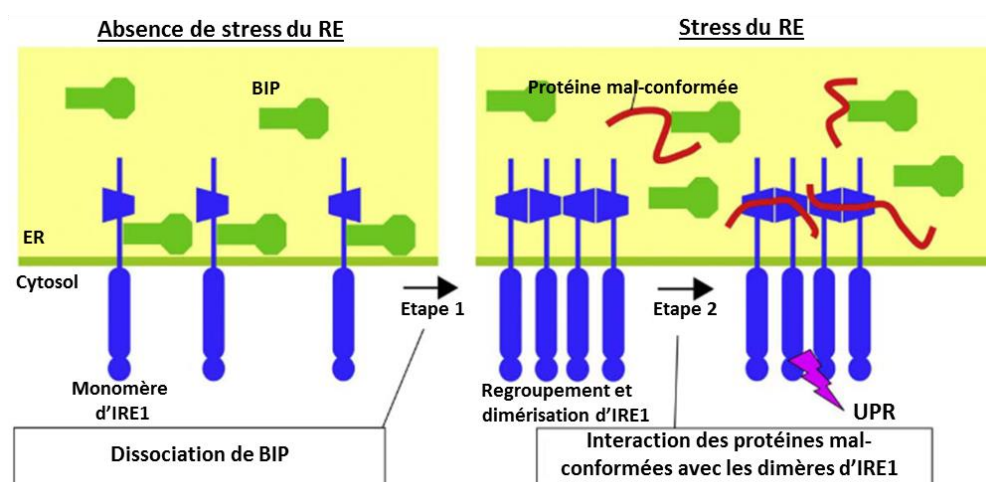
Cependant, le mécanisme d'activation des branches de l'UPR semble être plus complexe. En effet, l'inhibition de l'interaction entre BiP et IRE1 médiée par des mutations du site de fixation de BiP sur IRE1 est suffisante pour induire l'oligomérisation IRE1 mais est insuffisante pour activer la signalisation IRE1/XBP1 en absence de protéines mal-conformées [189]. Chez cet organisme, la dissociation de BiP ne serait donc pas suffisante pour induire l'UPR dépendante d'IRE1. Des études cristallographiques et biochimiques menées chez la levure et avec IRE1 $\beta$  de mammifère [190, 191] montrent qu'IRE1 est capable d'interagir avec des protéines mal-conformées via son domaine luminal. Cette interaction serait nécessaire à son activation puisque des mutations affectant ce domaine de liaison inhibent sa fonction. L'activation d'IRE1 chez la levure se ferait donc en deux étapes : la première nécessiterait la dissociation de BiP, favorisant ainsi la formation d'oligomères, la seconde serait dépendante de l'interaction de protéines mal conformées avec sa région luminale (Figure 17) [190, 191]. BiP serait également responsable de la désensibilisation au stress du RE en favorisant la désactivation d'IRE1 lorsque l'homéostasie du RE est rétablie [192].

Contrairement à IRE1 $\beta$ , IRE1 $\alpha$  est capable de lier BiP mais pas les protéines mal-conformées [191, 193]. Cette différence entre IRE1 $\alpha$  et IRE1 $\beta$  peut être expliquée par leur différence de séquence au niveau de leur région luminale [191].



**Figure 16 : La voie ATF6 de l'UPR.**

L'accumulation de protéines mal-conformées dans le RE induit la mise en évidence de signaux de localisation à l'appareil de Golgi au niveau du domaine luminal de la forme entière d'ATF6. Après transport dans cet organite, la protéine subit un double clivage qui produit une forme clivée d'ATF6. Celle-ci présente une activité transcriptionnelle favorisant la diminution du stress du RE. Adapté de [4].



**Figure 17 : Modèle d'activation de la détection du stress du RE par IRE1 chez la levure.**

En absence de stress du RE (à gauche), les monomères d'IRE1 sont associés à BiP qui inhibe leur dimérisation. L'accumulation de protéines mal-conformées dans le RE (à droite) provoque la dissociation de BiP qui interagit désormais avec ces protéines afin de favoriser leur bon repliement. Cette dissociation de BiP permet le regroupement des monomères d'IRE1 sous forme de dimères dont l'activation est optimale lorsqu'ils interagissent avec des protéines mal-conformées. D'après [194].

Les mécanismes de détection du stress du RE par PERK pourraient être identiques à ceux décrits pour IRE1 chez la levure. En effet, leurs domaines luminaux présentent de fortes similitudes et sont interchangeables. En condition de stress, la dissociation de BiP pourrait favoriser l'activation de PERK [195] qui serait complète lorsqu'il fixerait des protéines mal-conformées [194].

Tout comme pour IRE1 et PERK, l'activation d'ATF6 n'est pas seulement corrélée à l'interaction avec BiP. Le niveau de glycosylation d'ATF6 pourrait servir de senseur du stress du RE. En effet, en condition physiologique, la région luminale d'ATF6 est glycosylée au niveau de trois sites conservés, favorisant ainsi l'interaction avec la calréticuline qui la retient dans le RE. En condition de stress du RE, une diminution de cette glycosylation est observée, entraînant une diminution de son interaction avec la calréticuline. La mutation de l'un de ces sites augmente la quantité d'ATF6 nucléaire en absence de stress, ce qui démontre que la calréticuline piège ATF6 dans le RE [196].

Les ponts disulfures établis entre les domaines luminaux de différents monomères d'ATF6 pourraient également servir de senseur du stress du RE. En effet, ils contribuent à la stabilisation d'oligomères d'ATF6. En condition de stress, la formation de ces ponts disulfures est inhibée, permettant aux monomères de transloquer vers l'appareil de Golgi [197]. Des conditions de réduction incompatibles avec l'homéostasie du RE pourraient donc être spécialement et directement détectées par l'inhibition de la formation des ponts disulfures entre les monomères d'ATF6 [194].

### **2.2.2. Conséquences de l'UPR**

Les trois branches de l'UPR aboutissent à l'activation de facteurs de transcription à domaines b-ZIP qui vont interagir avec des séquences spécifiques de l'ADN. Ce domaine b-ZIP leur permet de former des homo- et des hétéro-dimères. XBP1 se fixe sur la séquence ERSE (ER Stress Element) [198] tout comme ATF6. Leur liaison avec la séquence ERSE se fait en collaboration avec le facteur de transcription NF-Y (Nuclear Factor-Y) [161, 199]. XBP1 est également capable de fixer la séquence UPRE (UPR Element) [199], ce qui est à l'origine de la différence de réponse entre ces deux branches de l'UPR. ATF4 reconnaît, quant à lui, la séquence AARE (Amino-Acid Response Element) [200] induisant donc une réponse différente des deux autres facteurs de transcription.

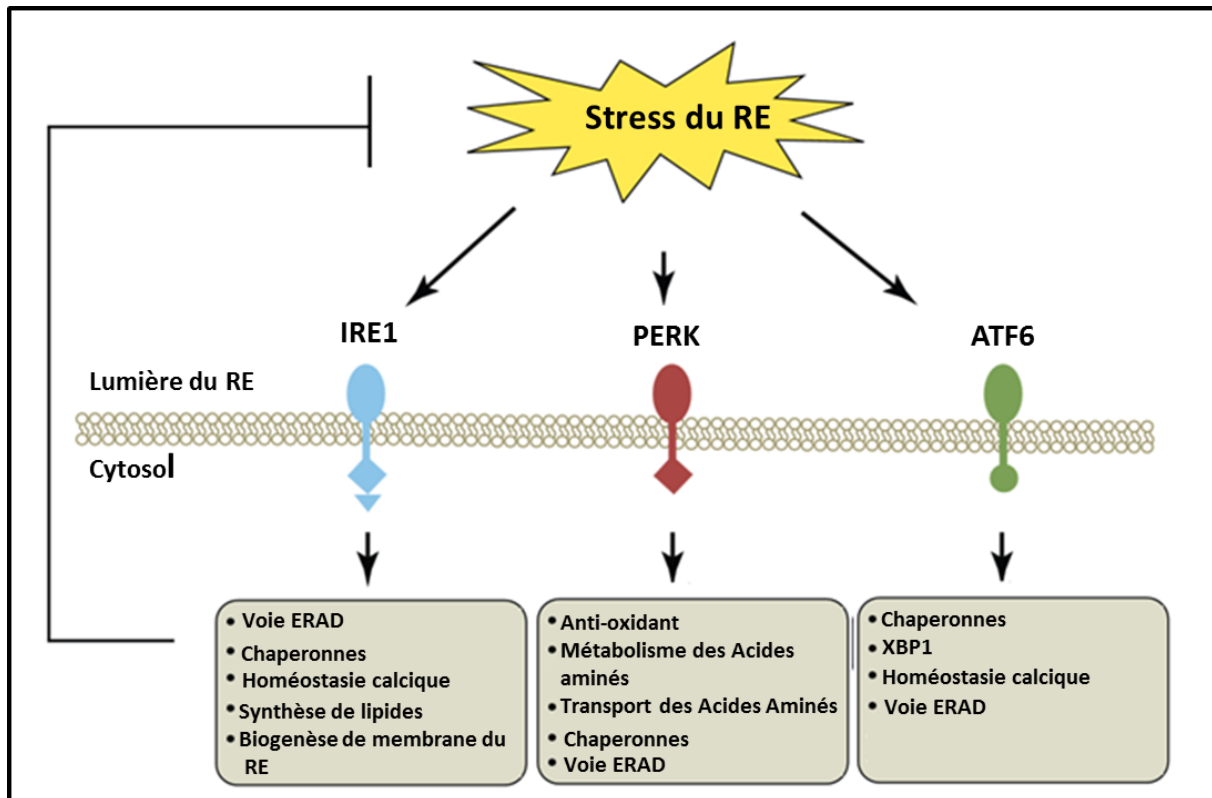
### 2.2.2.1. Adaptation au stress du RE

Chez les mammifères, afin de diminuer le stress du RE, les voies PERK [169], ATF6 [200] et IRE1 vont induire l'expression de protéines chaperonnes telles que Grp78/BiP, Grp94, la calréticuline ou les enzymes impliquées dans la formation des ponts disulfures comme PDI, Erp72 et ERO $\alpha$  [201, 202], mais également des enzymes responsables de la glycosylation des protéines afin de favoriser le bon repliement des protéines mal-conformées (Figure 18).

L'activité transcriptionnelle de la voie ATF6 précède celle d'IRE1. Elle est responsable d'un accroissement de l'expression d'*xbp1* qui est constitutivement faible [199]. Ceci suggère que la première phase de l'UPR se déroulerait en deux étapes. La première consisterait à diminuer la quantité de protéines mal-conformées en induisant l'augmentation des protéines et des enzymes impliquées dans le bon repliement des protéines suite à l'activation d'ATF6 et de PERK. Si cette activation est insuffisante pour rétablir l'homéostasie du RE, la voie IRE1 serait activée dans un second temps. Elle entraînerait la dégradation des protéines mal-conformées en promouvant l'expression de gènes impliqués dans la voie ERAD. En effet, des séquences UPRE, reconnues par XBP1, sont retrouvées en amont d'une grande majorité des gènes codant des protéines de cette voie [201]. Les branches PERK et ATF6 pourraient également réguler la voie ERAD en modulant l'expression d'un gène qui code une protéine favorisant le recrutement du protéasome à la membrane du RE [203].

ATF6 et IRE1 favorisent également l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> luminal qui est nécessaire au bon fonctionnement des protéines chaperonnes. En effet, l'activation d'ATF6 augmente l'expression de *SERCA2* chez les mammifères [200]. L'activation d'XBP1 inhibe l'expression de *RyR* et *IP3R*, qui sont impliqués dans la libération du Ca<sup>2+</sup> luminal, ayant ainsi un effet neuro-protecteur dans certains modèles mammifères et drosophiles de maladies neurodégénératives [204].

La voie PERK joue un rôle fondamental dans l'adaptation au stress cellulaire car, en plus des rôles détaillés précédemment, elle inhibe le déclenchement de l'apoptose en favorisant l'expression des gènes codant les IAP, cIAP1 et cIAP2 [205], et BI-1 (Bax Inhibitor-1). BI-1 est une protéine transmembranaire présente à la surface du RE qui est capable d'inhiber la protéine pro-apoptotique Bax, favorisant ainsi la survie cellulaire [206]. La voie PERK induit également spécifiquement l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse protéique, préparant ainsi la cellule à la reprise de la traduction lorsque le stress du RE sera résolu [200].



**Figure 18 : Rôle protecteur de l'UPR.**

L'activation des trois voies de l'UPR diminue le stress du RE en promouvant l'expression de gènes favorisant le bon repliement des protéines où à l'inverse leur dégradation, ce qui favorise un rétablissement de l'homéostasie du RE.

## 2.2.2.2. Apoptose dépendante du stress du RE

### 2.2.2.2.1. Apoptose dépendante de CHOP

En cas de stress prolongé du RE, les trois voies de l'UPR sont capables d'activer l'apoptose (Figure 19) en induisant l'expression du facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein) également connu sous le nom de Gadd153 (Growth arrest and DNA damage gene 153). Ce gène est l'un des gènes les plus fortement modulés durant l'UPR [200]. Sa délétion entraîne une diminution importante de la mort induite par le stress du RE dans un modèle murin [207]. A l'inverse, son expression est suffisante pour induire l'apoptose [208]. Le rôle d'ATF6 [200] et d'IRE1 [209] dans la régulation de CHOP semble moindre que celui de PERK [210, 211]. Ce gène serait une cible directe d'ATF4 [212].

CHOP peut former des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription de la famille C/EBP ou avec des facteurs de transcription n'appartenant pas à cette famille tels qu'ATF3. Il est également capable de s'homodimériser afin d'activer la transcription de certains gènes cibles [212].

CHOP induit la mort cellulaire en activant la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure 19) [213, 214]. En effet, la restauration génétique de Bcl-2 est suffisante pour sauver les cellules de l'apoptose induite par CHOP. De plus, CHOP inhibe l'expression du gène anti-apoptotique *bcl-2* et active celle des gènes pro-apoptotiques de la famille *bcl-2* *bim*, *puma* et *bax* [215].

CHOP peut également induire l'apoptose en augmentant le stress du RE. En effet, il a comme cible transcriptionnelle *GADD34*, qui favorise le retour de la traduction générale. L'activation de ce gène pourrait entraîner une saturation du RE en protéines mal-conformées, comme le suggère la diminution du niveau d'apoptose induite par un stress du RE en condition mutante pour *GADD34* [216].

CHOP augmente également l'expression du gène codant ERO1- $\alpha$  (ER Oxidase 1- $\alpha$ ) [216, 217] qui a un rôle équivalent aux PDI. En condition physiologique, ERO1- $\alpha$  favorise le bon repliement des protéines, mais il pourrait créer un environnement hyperoxydant favorisant la fuite d' $H_2O_2$  dans le cytoplasme lorsque sa quantité devient trop importante [216]. L'apoptose médiée par ERO1- $\alpha$  pourrait également dépendre du flux calcique. En effet, sa surexpression active IP3R en formant des ponts disulfures dans la région luminale du canal [216]. Cette activation d'IP3R induit une libération du  $Ca^{2+}$  luminal dans le cytosol [217, 218] qui aboutit



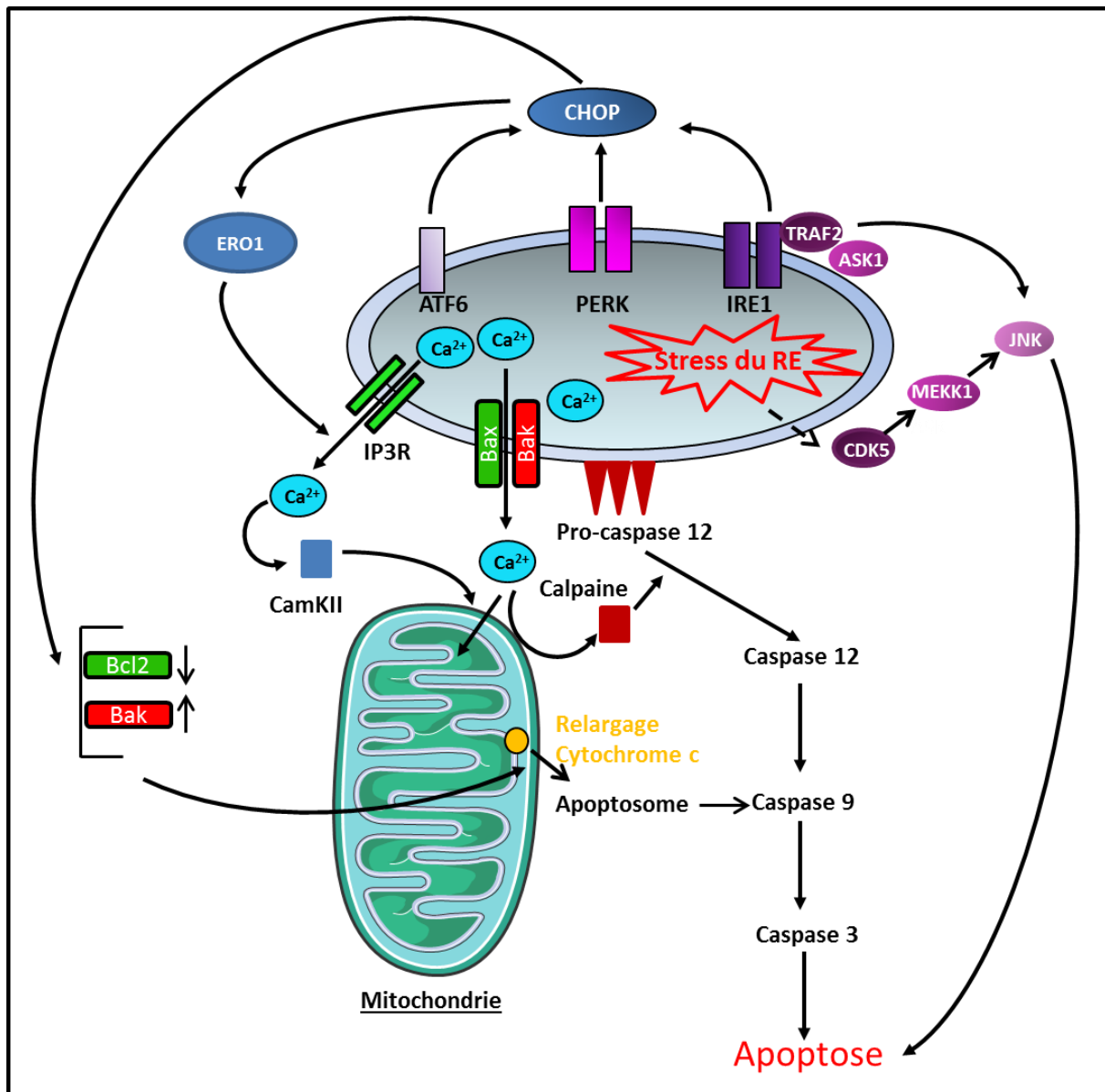
à l'activation d'une kinase impliquée dans la transduction du signal calcique, CaMKII (Calmodulin-dependent protein kinase II) (Figure 19). L'activation de CaMKII favorise la libération du cytochrome C, par l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et la perméabilisation de la membrane externe. Elle permet ainsi l'activation de l'apoptosome [218]. L'activation de CaMKII induit également l'expression du gène codant le récepteur de mort Fas *via* l'activation de la voie JNK, en régulant la phosphorylation de la MAP2K MKK4 [218]. CHOP peut donc activer la voie de mort extrinsèque en plus de la voie de mort mitochondriale. Il existe donc une voie CHOP-ERO1- $\alpha$ -IP3R-CAMKII impliquée dans l'induction de l'apoptose [217] chez les mammifères dans laquelle la libération du calcium luminal prend une part importante [219]. De manière intéressante, CHOP n'est pas conservée chez la drosophile. Il existe donc d'autres mécanismes d'induction de l'apoptose par l'UPR indépendants de CHOP.

#### 2.2.2.2.2. Apoptose dépendante de la voie IRE1/JNK

En cellules de mammifère, IRE1 $\alpha$  et IRE1 $\beta$  peuvent promouvoir l'apoptose en activant la voie JNK. En effet, l'activité kinase d'IRE1 permet le recrutement de TRAF2, indépendamment de l'épissage d'XBP1 en condition de stress du RE [220]. De plus, un modèle d'étude de la cytotoxicité induit par l'expression de protéines à domaine polyglutamine a permis de mettre en évidence que l'apoptose régulée par la voie IRE1 est dépendante de la voie JNK *via* un complexe formé par la MAP3K ASK1 avec TRAF2 [151] (Figure 19). La JNK activée phosphoryle Bcl-2 qui perd alors sa capacité à séquestrer Bax et Bid, et augmente la libération du calcium luminal aboutissant à l'augmentation du calcium mitochondrial et au déclenchement de l'apoptose [215].

#### 2.2.2.2.3. Apoptose dépendante des calpaïnes

Lors d'un stress du RE, l'augmentation de la quantité du calcium cytosolique peut favoriser l'activation et la relocalisation des calpaïnes à la membrane du RE (Figure 19). Ces cystéines-protéases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  jouent un rôle dans l'activation de la pro-caspase-12 qui est spécifique du stress du RE. En absence de stress, la pro-caspase-12 est maintenue à un état inactif par son interaction avec TRAF2 au niveau de la membrane du RE.



**Figure 19 : Induction de l'apoptose après un stress chronique du RE.**

Un stress prolongé du RE aboutit au déclenchement de l'apoptose *via* les trois branches de la réponse UPR qui régulent l'expression du facteur de transcription CHOP. Ce dernier promeut l'apoptose en activant la voie mitochondriale de l'apoptose : (1) en inhibant l'expression du gène anti-apoptotique *bcl-2* et en activant celle des gènes pro-apoptotiques tels que *bak* (2) et en activant la voie ERO1- $\alpha$ -IP3R-CAMKII. La branche IRE1 promeut également l'apoptose *via* l'activation de la voie JNK par la formation d'un complexe IRE1/TRAF2/ASK. La voie JNK peut également être activée par CDK5 indépendamment des trois branches de l'UPR. Durant le processus apoptotique, le calcium retenu au niveau du RE est libéré dans le cytosol où il contribue à l'activation de la caspase 12 via les calpaïnes.

Lors d'un stress du RE, l'interaction de TRAF2 avec IRE1 entraînerait la libération de la pro-caspase-12, qui pourrait alors activer à son tour la pro-caspase-9, et ainsi médier le déclenchement de l'apoptose par l'activation de la caspase 3. Cependant, l'implication de la pro-caspase-12 dans le déclenchement de l'apoptose consécutive à un stress du RE reste controversée. En effet, la calpaïne peut induire l'apoptose en son absence [215].

#### 2.2.2.2.4. Apoptose indépendante des trois branches

Une apoptose indépendante des trois branches principales de l'UPR (Figure 19) a pu être mise en évidence chez la drosophile grâce à un modèle d'étude de la rétinite pigmentaire autosomale dominante. Dans cette maladie progressive et héréditaire, la perte des photorécepteurs est causée par une accumulation de la rhodopsine-1 dans le RE. Cette apoptose résulte du stress du RE puisque la surexpression de gènes impliqués dans la voie ERAD inhibe la dégénérescence de la rétine. Cependant la déplétion des trois branches de la réponse UPR n'inhibe pas la réalisation de l'apoptose [221]. Celle-ci serait dépendante de la CDK5 (Cyclin-Dependent Kinase 5). Le mécanisme d'activation de CDK5 par le stress du RE n'est pas encore établi. Il pourrait dépendre des ions  $Ca^{2+}$  car de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie calcique modulent cette dégénérescence chez la drosophile [222]. Une fois activée, CDK5 interagit avec la MAP3K MEKK1 et la phosphoryle au niveau de deux sites consensus. Cette phosphorylation de MEKK1 permet l'activation de la JNK Bsk qui est responsable du déclenchement de l'apoptose [223].

#### 2.2.2.3. Survie versus apoptose

Selon la force du stress du RE, la réponse UPR peut induire deux destins cellulaires opposés : soit la survie cellulaire suite au rétablissement de l'homéostasie du RE après un faible stress, soit l'induction de l'apoptose dans le cas d'un stress trop important.

Cette différence entre ces deux conditions pourrait être due à une différence d'activation transcriptionnelle des cibles anti- ou pro-apoptotiques. Cependant une augmentation des niveaux de CHOP et BiP est observée dans les deux conditions. Contrairement à celle de BiP, l'augmentation de CHOP ne perdure pas dans le temps. Ceci n'est pas dû à une différence transcriptionnelle mais à une différence de stabilité des ARNm et des protéines. En effet, les ARNm et les protéines ayant des effets pro-apoptotiques tels que CHOP ou GADD34 sont

moins stables que ceux ou celles ayant des effets cytoprotecteurs comme BiP [224]. Dans le cas d'un faible stress, la quantité de protéines pro-apoptotiques est insuffisante pour déclencher l'apoptose avant que ces dernières soient dégradées. De plus, l'augmentation de BiP favoriserait l'inactivation des différentes branches de l'UPR en se liant à IRE1, ATF6 et PERK. Ces cellules seraient ainsi préconditionnées pour survivre plus facilement à un stress ultérieur puisqu'elles présentent une expression persistante de BiP. Lorsque le stress est plus important, la durée pendant laquelle CHOP est présente est plus longue et devient suffisante pour induire l'apoptose [211]. Chez la drosophile, les mécanismes permettant l'induction de l'apoptose après un stress du RE restent méconnus.

### **3. Le contrôle de la prolifération cellulaire**

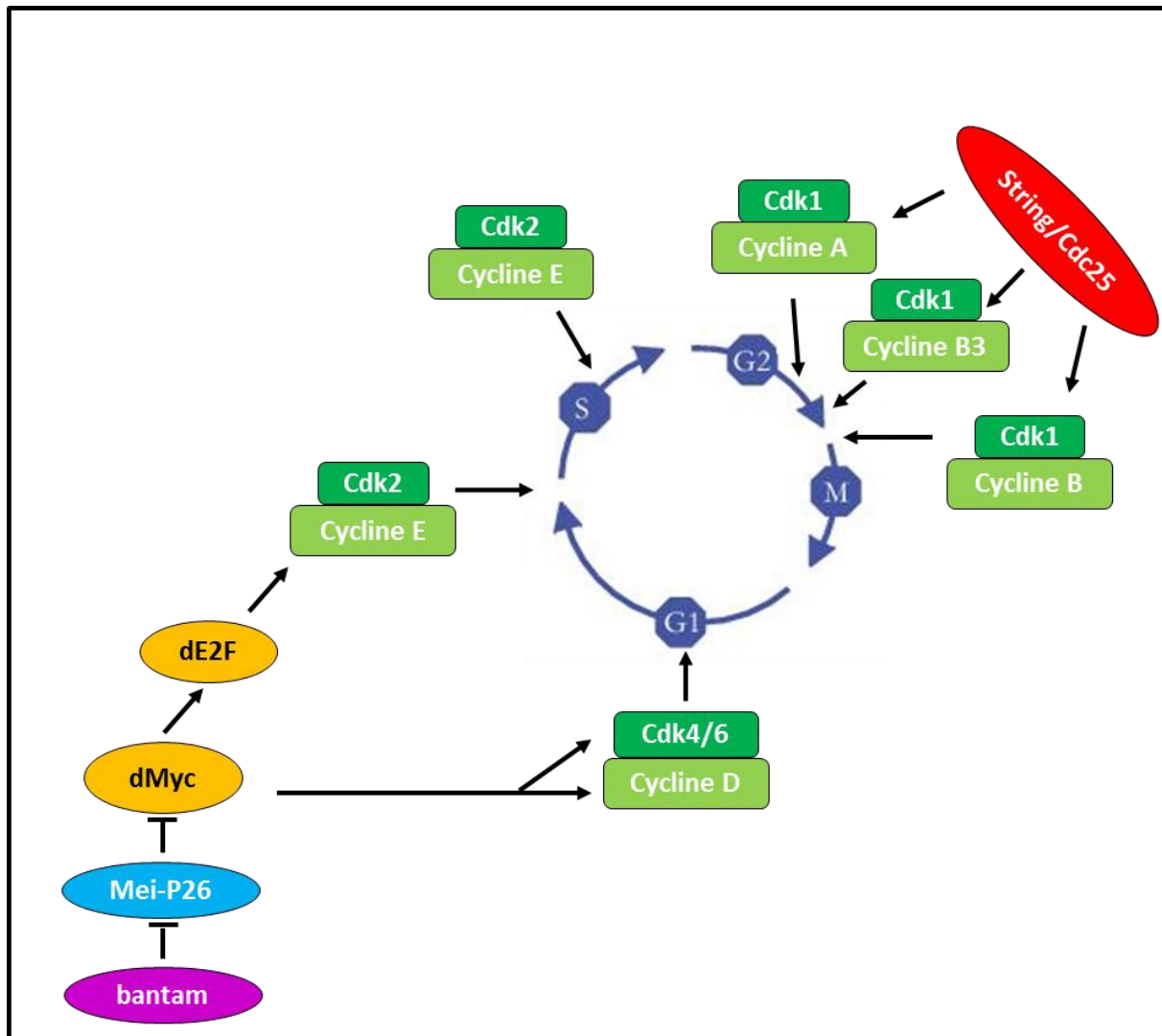
Le pendant de l'apoptose dans l'homéostasie tissulaire est le couple prolifération cellulaire/croissance du tissu. Ce couple est contrôlé par des facteurs extrinsèques ou intrinsèques [225]. Les facteurs extrinsèques, tels que la température et le stress, ont un effet sur la taille globale d'un animal et de ses organes, mais la proportion des organes et des tissus est déterminée par des programmes de croissance intrinsèques. Je détaillerai dans un premier temps la régulation du cycle cellulaire chez la drosophile, puis les mécanismes qui régulent le couple prolifération cellulaire/croissance des tissus.

#### **3.1. Le cycle cellulaire chez la drosophile**

Le cycle cellulaire canonique est conservé chez la drosophile et est caractérisé par les phases G1, S, G2 et M. Celui-ci peut connaître des variations suivant les phases du développement. Les cyclines, qui présentent un rôle durant le cycle cellulaire telles que les cyclines A, B, D et E ainsi que les CDK (Cyclin-Dependent Kinase) 1, 2, 4/6, qui sont leurs partenaires, y sont également conservées. La cycline D forme un complexe avec CDK4/CDK6, qui est l'homologue de CDK4 chez les mammifères, pour réguler la progression de la phase G1 tandis que le complexe formé de la cycline E et de CDK2 régule l'entrée en phase S [226]. Le complexe cycline A-CDK2 régule la progression de la phase S et les cyclines A, B et B3 régulent l'entrée en phase M en étant associées à CDK1 (Figure 20) [227].

#### **3.2. Régulation de la prolifération cellulaire/croissance du disque imaginal d'aile**

Durant ma thèse, mon système modèle d'étude afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire a été l'aile adulte de drosophile et plus particulièrement son précurseur, qui présente une forte prolifération, le disque imaginal d'aile. Je détaillerai donc par la suite les mécanismes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire/croissance du disque imaginal d'aile. Au début du premier stade larvaire, le disque imaginal d'aile est constitué de 30 à 40 cellules qui prolifèrent de façon homogène pour



**Figure 20 : Régulation du cycle cellulaire chez la drosophile.**

Lors de la transition G1-S, la quantité de cycline E est régulée par le facteur de transcription dE2F1 [228], l'orthologue de la protéine humaine E2F1. L'expression de *dE2F1* est elle-même régulée par le facteur de transcription dMyc [229]. D'autres cibles transcriptionnelles de dMyc favorisent également la transition G1-S. Il s'agit de *Cdk4/6* et *Cyclin D* [230]. La quantité de dMyc est-elle même contrôlée par l'ubiquitine E3 ligase Mei-P26 [231] dont la quantité de transcrits est modulée par le micro ARN *bantam*. Ce micro ARN est également impliqué dans la régulation de l'apoptose. Les complexes Cdk1-Cycline A et Cdk1-cycline B sont activés par la phosphatase String/Cdc25 qui favorise l'activation de Cdk1 [226] et donc la transition G2-M.

donner un tissu composé de 50.000 cellules. Cette forte prolifération est contrôlée par un certain nombre de facteurs qui peuvent également être requis pour l'arrangement spatial des tissus [232], en particulier des facteurs sécrétés à action paracrine qui agissent comme des morphogènes.

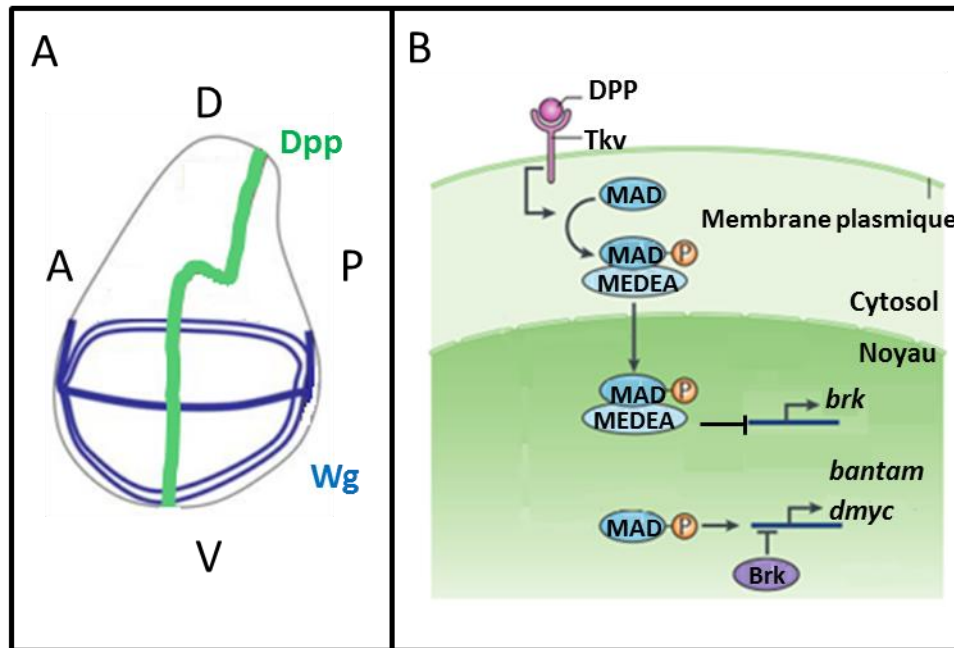
### **3.2.1. Les morphogènes**

Au cours du développement, chaque cellule connaît sa position au sein d'un tissu, et adopte un destin approprié en fonction de sa position. Généralement, cette information de position est fournie par un groupe de cellules particulières qui constituent un centre organisateur. Ces cellules sécrètent un signal morphogène formant un gradient de concentration au sein du tissu. La concentration locale en morphogènes permet aux cellules de déterminer la distance qui les sépare du centre organisateur.

Une molécule sécrétée est qualifiée de morphogène si elle agit directement sur des cellules distantes de sa source et si elle induit, au niveau de ces cellules, des réponses distinctes selon sa concentration locale. Chez la drosophile, les protéines sécrétées Wingless (Wg) , un membre de la famille Wnt, Hedgehog et Decapentaplegic (Dpp), un membre de la super famille des TGF- $\beta$ , remplissent ces conditions [233].

Dpp et Wg sont les deux morphogènes qui sont principalement impliqués dans le développement du disque imaginal d'aile. L'expression des gènes codant ces deux morphogènes est une conséquence de l'interaction entre les cellules des différents compartiments du disque. Le disque imaginal d'aile est constitué d'un compartiment antérieur, d'un compartiment postérieur, d'un compartiment dorsal et d'un compartiment ventral. Dpp est produit par une bande de cellules antérieures à la frontière des compartiments antéro/postérieur (A/P). A partir de la fin du second stade larvaire, Wg est sécrété par les cellules adjacentes à la frontière dorso-ventrale (D/V). Dès le début du troisième stade larvaire, Wg est également produit dans un domaine formant un anneau à la limite entre la poche et la charnière du disque. A la fin du troisième stade larvaire, un second anneau de Wg est formé en position plus proximale (Figure 21A) [234].

En plus de déterminer le devenir cellulaire, les morphogènes ont un rôle de mitogènes. En effet, la prolifération cellulaire est réduite au niveau des disques imaginaires d'aile chez les mutants perte de fonction de *dpp* et de *wg*. A l'opposé, leur surexpression induit une surprolifération qui se traduit par le développement d'une aile ectopique [235, 236].



**Figure 21 : Le morphogène Dpp induit une prolifération homogène au sein du disque en inhibant l'expression de *brk*.**

(A) Dpp (vert) est sécrété par une bande de cellules antérieures à la frontière A/P et forme un gradient selon l'axe antéro-postérieur. Wg (bleu) est sécrété par les cellules de la frontière D/V et par deux anneaux cellulaires bordant la poche du disque. (B) L'interaction de Dpp avec son récepteur Tkv aboutit à la formation du complexe Mad/Medea par phosphorylation (P). Ce complexe inhibe l'expression de *brk*, ce qui favorise celle de *dmyc* et de *bantam*. Adapté de [240].



### **3.2.1.1. Les voies de signalisation**

#### **3.2.1.1.1. La voie Dpp**

Dpp a deux récepteurs nommés Thickveins (Tkv) et Punt (Figure 21B). Après son interaction avec Dpp, Punt, qui est constitutivement activé, phosphoryle Tkv qui, à son tour, phosphoryle le facteur de transcription Mad (Mothers Against Dpp). La forme phosphorylée de Mad (pMad) est alors capable d'interagir avec son co-facteur Medea. Ce complexe est ensuite transloqué au noyau où il se fixe notamment sur le locus du répresseur transcriptionnel *brinker* (*brk*). Le complexe Mad/Medea y recrute Schnurri qui réprime la transcription de *brk*. L'expression de *brk* est donc plus ou moins inhibée suivant la concentration en Dpp. Brk forme donc un gradient inversement proportionnel à celui formé par Dpp. La concentration de Brk détermine le niveau transcriptionnel de ses gènes cibles, qui varie donc en fonction de l'axe A/P tel le gradient de Dpp [237].

#### **3.2.1.1.2. La voie Wg**

La voie de signalisation Wg dépend de son interaction avec son récepteur Frizzeld et le corécepteur Arrow/LRP (LDL-receptor related protein). La fixation de Wg avec ce complexe stabilise Armadillo qui est la  $\beta$ -caténine de drosophile. Cette protéine a différents rôles. Elle est capable de favoriser l'adhésion cellulaire au niveau des jonctions adhérentes, mais elle peut également migrer au noyau où elle lie le facteur de transcription Pangolin, qui correspond au facteur TCF (T-cell factor) des mammifères [238]. Cette interaction permet d'induire l'expression de gènes cibles en réponse au signal Wg dans les cellules en fonction de la distance qui les sépare des cellules sécrétrices de Wg [239].

### **3.2.1.2. Morphogènes et prolifération cellulaire**

#### **3.2.1.2.1. Régulation de la prolifération par Dpp**

Bien que l'implication de Dpp dans la régulation de la croissance du disque imaginal d'aile ait été mise en évidence il y a une vingtaine d'années, son mécanisme d'action est encore débattu

aujourd'hui. Ceci est dû au fait que Dpp forme un gradient alors que la prolifération cellulaire est homogène dans l'ensemble du disque. De nombreux modèles ont été établis pour essayer d'expliquer ce paradoxe.

Actuellement trois modèles sont encore débattus. Le plus ancien est le modèle « gradient » basé sur la différence de Dpp disponible entre deux cellules voisines. Cette différence serait nécessaire et suffisante pour induire une prolifération homogène dans l'ensemble du disque [241]. Cependant un second modèle a permis d'établir qu'une cellule proliférerait lorsque la concentration locale de Dpp à son niveau augmente de 50%. Ce ne serait donc pas la différence de concentration entre les cellules voisines qui favoriserait la prolifération uniforme au niveau du disque mais l'augmentation de la quantité de Dpp à un point précis au cours du temps [240].

Dans le troisième modèle, le gradient et l'augmentation de Dpp ne serait que des corrélations et ils ne seraient pas responsables de l'induction de la prolifération homogène au sein du disque. Ce modèle défend l'hypothèse que Dpp favorise la prolifération en inhibant l'expression de *brk* (Figure 21B). En effet, des clones perte de fonction pour la signalisation Dpp et pour Brk sont capables de proliférer normalement [242], alors que la perte de fonction de *dpp* inhibe la prolifération cellulaire dans l'ensemble du disque [243]. Par ailleurs, l'expression de Brk est suffisante pour inhiber la prolifération [241, 244], alors que sa perte de fonction induit une surcroissance [245]. Brk inhiberait la prolifération en diminuant la transcription de *bantam* [244, 246] et de *dmyc* [247].

Dans la région médiane du disque, l'inhibition de la transcription de *brk* par la signalisation Dpp régulerait donc, entre autres, la prolifération cellulaire en augmentant la quantité de dMyc et de microARN bantam [247]. Cette hypothèse impliquerait que la prolifération dans les régions latérales, là où *brk* est fortement exprimée, pourrait être modulée par un autre facteur puisque la prolifération est homogène dans l'ensemble du disque.

#### 3.2.1.2.2. Régulation de la prolifération par Wg

Wg peut réguler la prolifération de différentes façons. Tout d'abord, Wg module la prolifération des cellules embryonnaires qui donneront le système nerveux périphérique en régulant la transcription de la cycline E via l'activation de Pangolin [248]. Dans le disque imaginal d'aile, Wg module la prolifération cellulaire via l'intermédiaire de l'une de ses cibles transcriptionnelles nommée *vestigial* (*vg*) [249, 250]. En effet, une diminution de

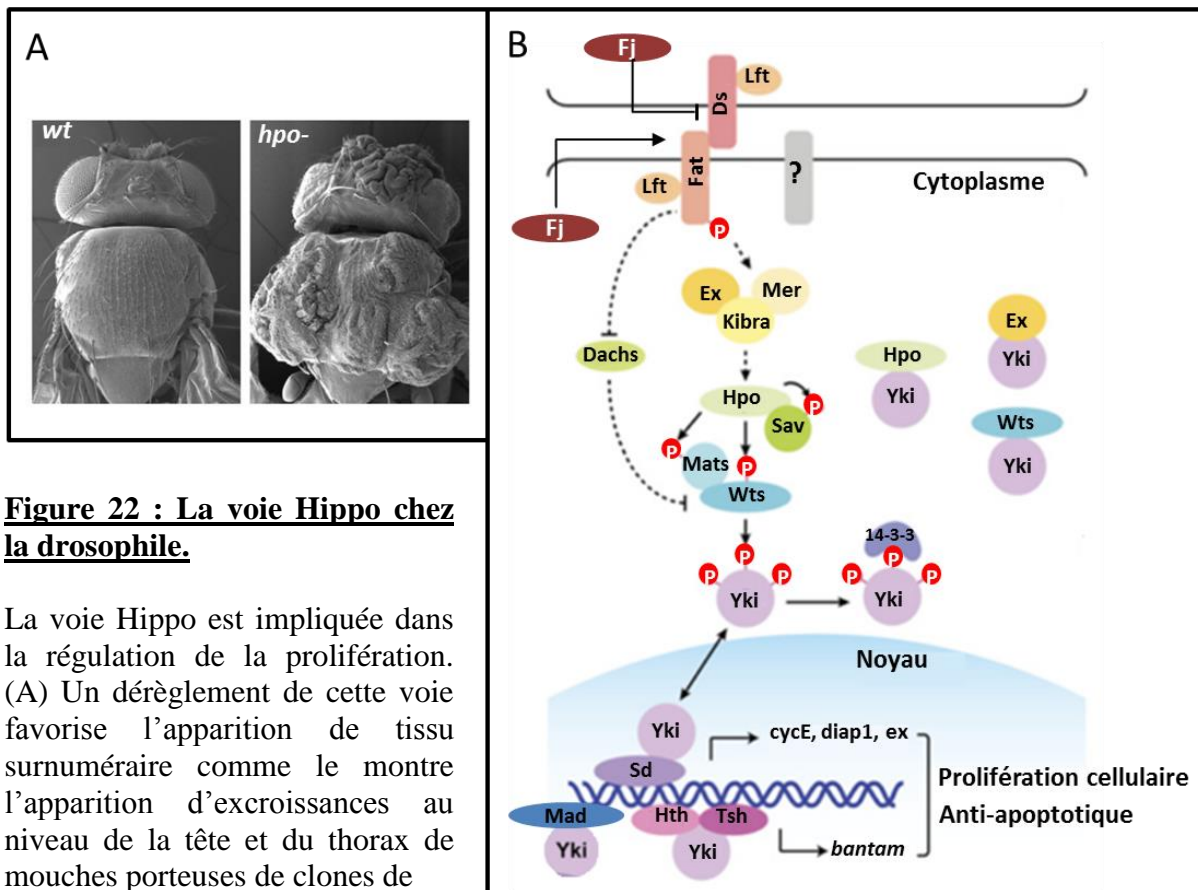
l'expression de *vg* provoque une diminution de la taille de l'aile à la suite d'un rallongement de l'ensemble des phases du cycle et donc d'une réduction de la prolifération [251]. De plus, une expression ectopique de *vg* favorise la transition G1-S et G2-M en augmentant transcriptionnellement la quantité de *dE2F1* et de *string* [252].

### 3.2.2. La voie Hippo

Les voies de signalisation de Dpp et Wg interagissent avec une voie de signalisation connue pour réguler la prolifération chez les mammifères et la drosophile, la voie Hippo. Cette voie, découverte chez la drosophile, régule à la fois l'apoptose et la prolifération (Figure 22A). Des dérèglements de cette voie sont retrouvés dans un certain nombre de cancers. Les premiers composants de la voie qui ont été mis en évidence par des cribles génétiques sont les gènes *warts* (*wts*), *hippo* (*hpo*) et *salvador* (*sav*). Les produits de ces trois gènes sont considérés comme constituant le cœur de cette voie qui peut être activé de différentes manières.

La voie Hippo peut être activée par des interactions cellule-cellule *via* la liaison de la protocadhérine Dachsous (Ds), présente au niveau de la membrane plasmique d'une cellule voisine, à la protocadhérine Fat (Figure 22B). Cette voie est régulièrement appelée voie Fat/Hippo. Cette liaison est modulée par la kinase associée à l'appareil de Golgi, Four-Jointed (Fj), et par Lowfat. Fj phosphoryle Fat et Ds, dans l'appareil de Golgi, au niveau de leur domaine extracellulaire respectif. Ces phosphorylations de Fat par Fj promeuvent la liaison Fat-Ds tandis que les phosphorylations de Ds l'inhibent [253]. Fat activée peut alors inhiber l'activité de Dachs. Dachs a un rôle prépondérant dans la signalisation médiée par Fat puisque son absence peut inhiber complètement les phénotypes de surcroissance induits par la perte de fonction de Fat. Lorsque Fat est activée, Dachs est présente au niveau de la membrane plasmique. Dans le cas inverse, Dachs se relocalise dans le cytosol où elle favorise le turn-over de la kinase Wts [253].

En parallèle, Fat peut également activer Expanded (Ex) qui forme un complexe avec Merlin (Mer) et Kibra. Ce complexe favorise la localisation de la kinase Hpo à la membrane plasmique [254]. Cette concentration de Hpo au niveau de la membrane facilite son homodimérisation et son activation [255]. Le complexe formé de Hpo et de la protéine adaptatrice Sav phosphoryle et active Mats qui peut alors interagir avec Warts et induire son activation par auto-phosphorylation [256].



**Figure 22 : La voie Hippo chez la drosophile.**

La voie Hippo est impliquée dans la régulation de la prolifération. (A) Un dérèglement de cette voie favorise l'apparition de tissu surnuméraire comme le montre l'apparition d'excroissances au niveau de la tête et du thorax de mouches porteuses de clones de

cellules dépourvues de la kinase Hpo. Adapté de [257]. (B) L'activation de la voie Fat/Hippo se traduit par une cascade de phosphorylation (P) favorisant la rétention cytoplasmique du co-facteur de transcription Yki via la phosphorylation médiée par la kinase Wts. Yki peut également être piégé dans le cytoplasme par interaction direct avec Ex, Wts et Hippo. Lorsque l'inhibition est levée, Yki migre au noyau en interagissant avec ses co-facteurs Sd, Mad, Hth (Homothorax) ou Tsh (Teashirt) et en favorisant l'expression de ses cibles transcriptionnelles, telles que la *cycline E*, *bantam*, *expanded*, *diap1*, qui stimulent directement ou indirectement la prolifération cellulaire. Adapté de [258].

La kinase Wts activée induit la phosphorylation du co-activateur de transcription Yki au niveau de différents résidus. La phosphorylation de Yki au niveau de la sérine 168 induit sa liaison avec la protéine 14-3-3 favorisant ainsi sa rétention cytoplasmique. Yki peut également être retenu dans le cytoplasme par une interaction directe avec Ex, Wts, ou Hpo. L'activation de la voie Hippo aboutit donc à l'inhibition de l'activation du co-facteur de transcription Yki [259].

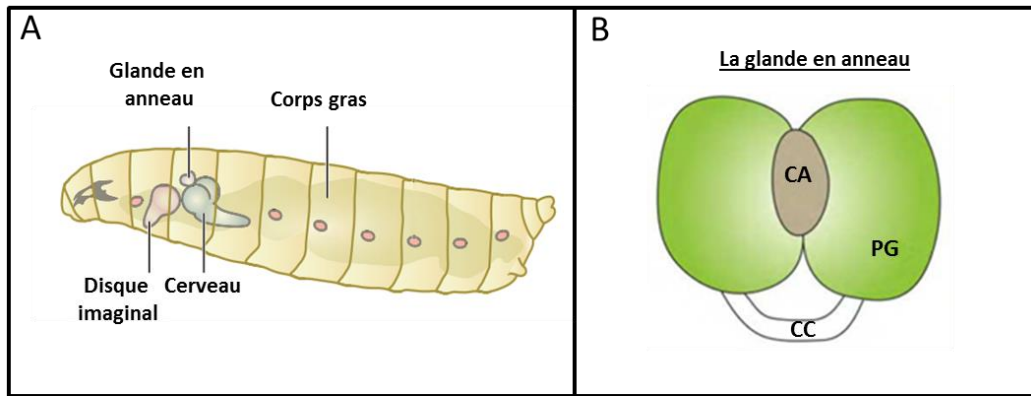
Lorsque l'inhibition de Yki est levée, il migre au noyau en se liant, entre autre, à son cofacteur Scalloped (Sd) qui possède une séquence de localisation nucléaire [260]. Yki régule alors l'expression de gènes cibles impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que ceux codant la cycline E, dMyc, bantam et dE2F1. En parallèle de la progression du cycle cellulaire, Yki inhibe le déclenchement de l'apoptose en favorisant l'expression du gène codant DIAP1 et le micro-ARN bantam qui cible une région promotrice du gène codant la protéine RHG Hid [259].

Yki ne peut pas se lier directement à l'ADN. Il doit interagir avec différents cofacteurs tels que Scalloped, qui a été mis en évidence chez les mammifères et la drosophile. Cependant, Scalloped n'est pas présent dans tous les types cellulaires [261] et il est requis uniquement pour la régulation de la prolifération de certaines cellules du disque d'aile [262]. Yki est également capable d'interagir avec Mad, qui, je le rappelle, est impliqué dans la voie de signalisation Dpp [246].

Les liens entre la voie Hippo et la voie Dpp sont actuellement débattus. Deux modèles s'opposent. Le premier propose une régulation directe de la voie Hippo par la voie Dpp. Il est fondé sur le fait que Dpp est capable de moduler le niveau protéique du ligand Ds et du modulateur de liaison Fj [263], ce qui pourrait inhiber l'activation de Fat [264]. Cependant, une étude récente montre que l'expression uniforme de *dpp* dans l'ensemble du disque n'empêche pas l'établissement du gradient de Fj et de Ds et qu'elle ne modifie pas l'activité de Fat. Dans le second modèle, ces deux voies agiraient donc de façon indépendante et complémentaire pour établir une prolifération uniforme dans l'ensemble du disque [265].

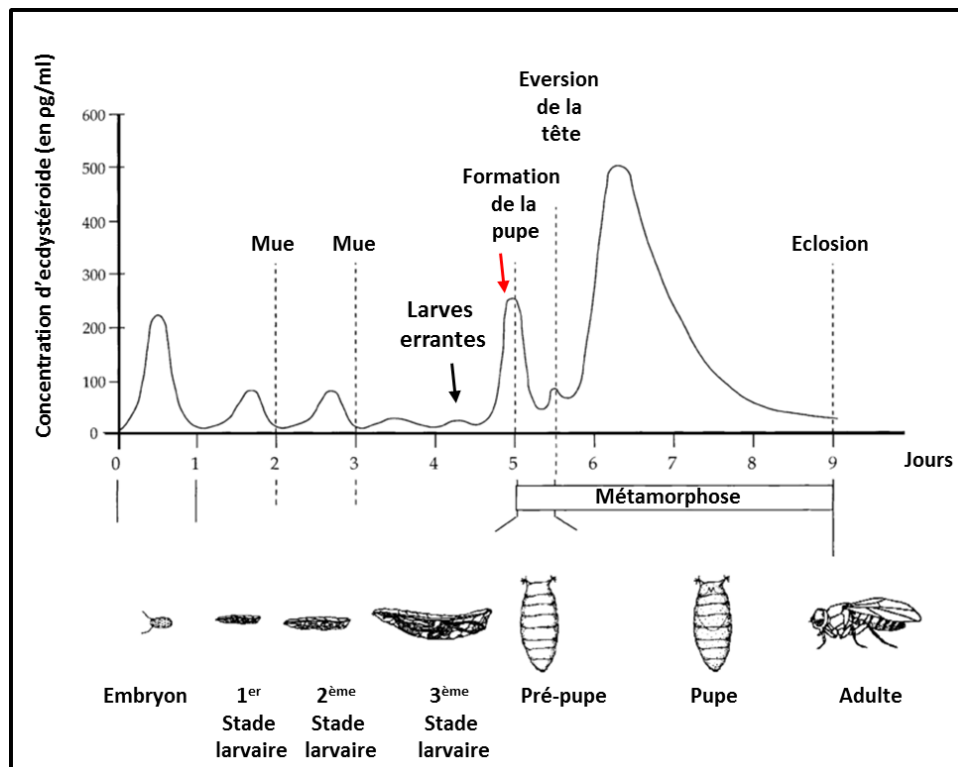
Hippo peut également moduler la signalisation Wg car *wg* est une cible transcriptionnelle de Yki [266]. Réciproquement, Wg pourrait également moduler l'activation de la voie Hippo en participant à l'établissement des gradients de Fj et Ds via la régulation transcriptionnelle de *vestigial* [267]. Le produit de cette cible transcriptionnelle pourrait entrer en compétition avec Yki pour former un complexe transcriptionnel avec Sd [261].

La prolifération, qui est massive au sein du disque d'aile, est donc finement régulée par un ensemble de voies de signalisation interconnectées. Cependant, l'augmentation de la taille



**Figure 23 : La glande en anneau.**

(A) Chez la larve de drosophile, la glande en anneau est un organe important dans la régulation du développement. Elle est située entre les deux lobes du cerveau. (A) Adapté de [268]. (B) Cette glande est constituée de la glande prothoracique (PG), du *corpus allatum* (CA) et du corps cardiaque (CC). L'ecdysone est synthétisée au niveau de la PG. Adapté de [269].



**Figure 24 : Profil de sécrétion de l'ecdysone au cours du développement de la drosophile.**

Des pics d'ecdysone provoquent chacune des transitions développementales chez la drosophile. Les transitions majeures sont indiquées par des pointillés. Le troisième stade larvaire dure en moyenne 48 heures. En fin de ce stade, soit au quatrième jour de développement à 25°C, un léger pic d'ecdysone (flèche noire) induit la sortie des larves du milieu. Ces larves dites « errantes » arrêtent alors de s'alimenter et de croître. Un pic d'ecdysone (flèche rouge) intervenant au cinquième jour de développement induit la pupaison. Cette dernière correspond à l'entrée de la période de métamorphose durant laquelle l'adulte sera formé à partir des tissus larvaires. Adapté de [269].

d'un tissu est coordonnée à celle des autres tissus de l'organisme, suggérant l'existence d'une communication entre les différents tissus de l'organisme.

### **3.3. Régulation de la croissance tissulaire au sein de l'organisme**

Au cours du développement, la taille des tissus augmente de façon coordonnée avec celle de l'organisme. Des mécanismes sont donc nécessaires pour évaluer la taille des tissus et de l'organisme, pour coordonner son augmentation et la stopper quand une taille idéale est atteinte. Chez les arthropodes et la drosophile en particulier, les adultes présentent un exosquelette et ne muent pas. Ils ne peuvent donc pas grandir. Par conséquent la taille de l'adulte est définie par la taille de la larve avant le début de la métamorphose. De même, la taille des différents tissus est définie par la taille des disques imaginaux à la fin du développement larvaire. Les mécanismes qui contrôlent la régulation de la métamorphose semblent donc avoir un rôle primordial dans la régulation de la taille des tissus et de l'organisme. La durée de chaque étape du développement larvaire est contrôlée par la libération d'hormones, en particulier les ecdystéroïdes [270].

#### **3.3.1. L'ecdysone**

Durant son développement, la larve subit plusieurs mues qui sont contrôlées par le système endocrinien qui comprend le cerveau et une partie de la glande en anneau, la glande prothoracique, (Figure 23). Cette dernière est le lieu de biosynthèse de l'ecdysone qui requiert l'action d'enzymes de la famille Halloween, comme Spook, Spookier, Phantom, Disembodied et Shadow. Ces enzymes sont impliquées dans la conversion du cholestérol en ecdysone [271]. Elles sont en partie régulées par la disponibilité en nutriments via la voie de l'insuline. L'ecdysone est sécrétée dans l'hémolymph où elle est convertie en sa forme active, la 20-hydroxyecdysone (20E).

Cette hormone est responsable du déclenchement des mues, de la métamorphose et donc de l'arrêt de la phase d'augmentation de la taille de la larve (Figure 24) [272]. L'entrée en métamorphose est caractérisée par une rapide augmentation de la quantité d'ecdysone produite en fin de troisième stade larvaire (L3) [272]. L'activité de la 20E passe par sa fixation à un hétérodimère composé de deux récepteurs nucléaires nommés EcR (Ecdysone Receptor)

et Usp (Ultraspiracle), qui active la transcription de gènes nécessaires aux changements physiologiques, morphologiques, et comportementaux associés à la mue et à la métamorphose [268, 273].

### **3.3.1.1. Voie de l'insuline**

Chez la drosophile, la voie de signalisation de l'insuline est également appelée voie InR/PI3K/Akt/Foxo. En effet, elle implique un seul récepteur, InR (Insulin receptor), ainsi que les kinases PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase) et Akt, et le facteur de transcription à domaine Forkhead, Foxo. Une mutation de l'un de ces composants est suffisante pour induire une modification de la taille et du nombre de cellules d'un tissu [274]. Chez la drosophile, il existe sept peptides ressemblant à l'insuline, classés de Dilp1 à Dilp7 (Drosophila insulin-like peptide). Ils possèdent six cystéines conservées qui relient par des ponts disulfures les deux chaînes A et B des formes actives de cette famille de ligands du récepteur à l'insuline [275, 276].

Durant le développement, les gènes codant ces ligands sont exprimés par différents tissus. Les gènes *Dilp4* et *6* sont exprimés au niveau de l'intestin et *Dilp7* l'est au niveau de la corde nerveuse ventrale [276]. *Dilp2* est exprimé au niveau des glandes salivaires de la larve de troisième stade, au niveau des disques imaginaux et également par des petits groupes de cellules dans le cerveau, nommées IPC (Insulin-Producing Cells) [276]. Les Dilp1, 3 et 5 sont également produits au niveau des IPC. L'ablation des IPC induit un retard d'entrée en métamorphose de sept jours qui peut être corrigé par une surexpression de *Dilp2*, montrant que la sécrétion des Dilp par les IPC joue un rôle fondamental dans le contrôle du temps de développement, et donc de la croissance systémique [277].

La sécrétion de Dilp2 et 5 au niveau des IPC est régulée par un signal émis par le corps gras qui sert de senseur de la disponibilité en nutriments. Il s'agit d'Unpaired2, une protéine similaire aux cytokines de type I, qui est sécrétée par le corps gras quand les réserves en graisse sont suffisantes pour poursuivre le développement. Unpaired2 active la voie JAK/STAT, dont il est un ligand, au niveau d'une population de neurones GABAergiques, ce qui aboutit indirectement à la sécrétion des Dilp par les IPC [278] (Figure 25A). En cas de carence en nutriments, les Dilp ne sont plus sécrétés et s'accumulent dans les IPC [279].

De manière similaire à l'ablation des IPC, l'expression d'une forme dominante négative de PI3K dans la glande prothoracique induit un délai de l'entrée en métamorphose. Ce rallongement de la phase larvaire est causé par une diminution de la quantité d'ecdysone.



Etant donné que la phase de croissance est plus longue, cela se traduit par une augmentation de la taille des larves de troisième stade larvaire, des pupes et des adultes. Ces effets peuvent être abolis en ajoutant de la 20E dans la nourriture des larves. A l'inverse, l'expression de la PI3K dans la glande prothoracique promeut une augmentation de la synthèse d'ecdysone, ce qui se traduit par une réduction de la taille des pupes [280, 281].

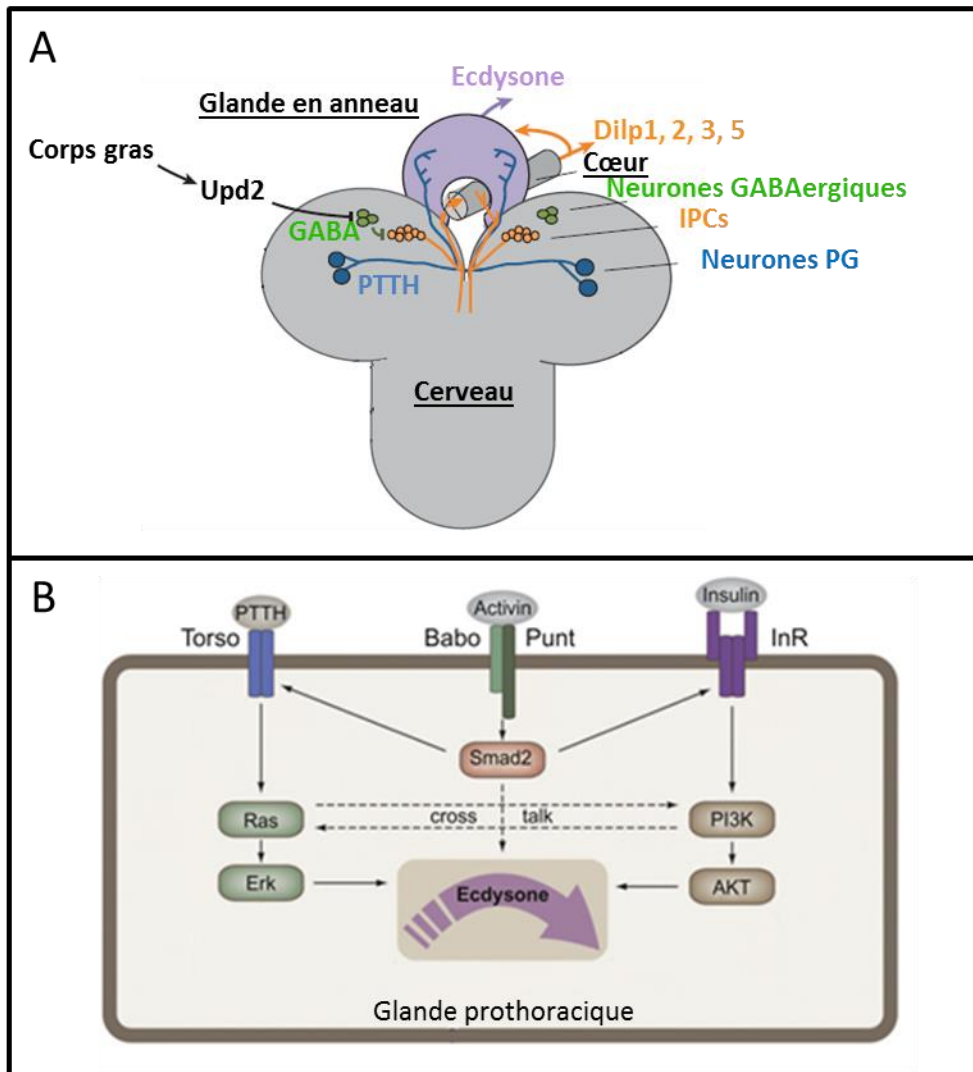
Le mécanisme d'action de la voie InR/PI3K serait de favoriser l'expression des gènes *disembodied* et *spookier* qui sont impliqués dans la biosynthèse de l'ecdysone [282]. La voie InR/PI3K régule donc l'expression de l'ecdysone et le temps de développement [280] en fonction de la quantité de nutriments [283]. Elle permet à l'organisme de détecter si la quantité de réserves accumulées par la larve est suffisante pour la survie de l'organisme durant la métamorphose [284].

### 3.3.1.2. Voie PTTH/ERK

La synthèse d'ecdysone au niveau de la glande prothoracique est également régulée par une voie indépendante de la voie InR/PI3K [281] qui dépend de l'hormone PTTH (ProThoracicoTropique Hormone). Celle-ci est produite par une paire de neurones, localisés dans chaque lobe du cerveau [271] qui innervent la glande prothoracique, d'où leur nom de PG (Figure 25A).

La structure de la PTTH est similaire à celle de certains facteurs de croissance de mammifères, tels que le  $\beta$ -NGF ( $\beta$ -Nerve Growth Factor) et le TGF- $\beta$ 2 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 2) [285]. Cette hormone est capable de se lier à Torso qui est un récepteur tyrosine kinase présent au niveau de la glande prothoracique [286]. La fixation de PTTH avec son récepteur aboutit à la phosphorylation et à l'activation de la MAPK ERK, par l'activation successive des membres de la voie incluant les homologues de la petite GTPase Ras (Ras85D) et de sa cible dRaf [281, 287]. L'activation d'ERK induit la synthèse d'ecdysone en favorisant la transcription de gènes impliqués dans sa voie de biosynthèse tels que *disembodied*, *phantom* et *shadow* [282]. Des mutations de ces différents gènes induisent une modification du temps de développement qui est corrélée à une modification de la taille des pupes et donc des adultes, tout comme l'ablation des neurones exprimant PTTH [281, 286, 288].

La voie PTTH ne ferait pas le lien entre la croissance cellulaire et l'environnement nutritionnel, contrairement à la voie InR/PI3K [283]. Il semblerait que PTTH impose un rythme à l'expression de l'ecdysone en communiquant une information temporelle [288]. En effet, l'expression de PTTH est cyclique, avec une périodicité de 8 heures, durant le troisième



**Figure 25 : Régulation de la synthèse de l'ecdysone dans la glande prothoracique.**

(A) La synthèse de l'ecdysone a lieu dans la glande prothoracique qui est localisée dans la glande en anneau. Elle est régulée en fonction de la disponibilité en nutriments. En absence de nutriment, une population de neurones GABAergiques inhibe la libération des Dilp par les IPC. A l'inverse une alimentation riche en sucre et en graisse induit la sécrétion d'Unpaired2 par le corps gras. Unpaired2 active la voie JAK/STAT au niveau de neurones GABAergiques, ce qui lève l'inhibition de la sécrétion des Dilp. Dilp1, 2, 3 et 5 (orange) sont alors sécrétés dans l'hémolymph par les IPC. La synthèse de l'ecdysone est également régulée par l'hormone PTTH (ProThoracicotropic Hormone) qui est produite de façon cyclique par les neurones PG innervant la glande prothoracique. Adapté de [289] (B) L'interaction de PTTH et des Dilp avec leur récepteur spécifique, Torso et InR, induit respectivement l'activation de la voie ERK et de la voie PI3K qui favorisent la synthèse de l'ecdysone en augmentant la quantité des protéines de la famille Halloween. La voie Activine permet de coordonner l'activité de ces deux voies en modulant l'expression de certains de leurs composants. Adapté de [290].

stade larvaire. Son pic d'expression précède celui de la synthèse d'ecdysone avant le début de la pupaison et sa libération serait régulée par les neurones de l'horloge circadienne dont l'extrémité axonale est retrouvée au niveau de l'arborescence dendritique des neurones PG [288].

### **3.3.1.3. La voie de l'activine**

Une étude récente a mis en évidence l'existence d'une troisième voie capable de réguler la synthèse d'ecdysone. En effet, l'inhibition au niveau de la glande prothoracique de la voie de l'activine, un membre de la super famille des TGF $\beta$ , provoque une diminution transcriptionnelle des gènes de la famille *halloween* et un arrêt de développement au second stade larvaire. Cette voie contrôle l'expression de différents acteurs clés des voies de signalisation de l'insuline et de PTTH (Figure 25B). Par exemple, l'inhibition de dSmad2, un constituant de la signalisation activine, abolit l'expression de *torso* mais également celle d'*InR*, de *Pi3K* et d'*AKT* [282]. En modulant l'activation des voies InR/IP3K et PTTH/ERK, la voie activine pourrait donc permettre d'intégrer les signaux de l'environnement nutritionnel à ceux de l'horloge circadienne lors de la synthèse de l'ecdysone afin de permettre une progression développementale optimale.

### **3.3.2. Ecdysone et cycle cellulaire**

La régulation de la synthèse de l'ecdysone est essentielle pour réguler la croissance et la détermination de la taille finale chez la drosophile. Cependant, les mécanismes qui permettent de relier l'ecdysone au contrôle du cycle cellulaire sont encore à ce jour méconnus. Quelques études ont fait progresser la connaissance de ce sujet. Des expériences de puces d'expression ont permis de mettre en évidence que l'ecdysone est associée à l'induction de l'expression de gènes clés du cycle cellulaire codant notamment les cyclines B et D, ainsi que Cdk2 durant la métamorphose de l'intestin [291]. L'ecdysone, via l'activation de son récepteur, régule également l'expression de *string*, favorisant ainsi la prolifération des histoblastes abdominaux (équivalents à des disques imaginaux pour l'abdomen) durant le stade pupal [292]. La prolifération des cellules des disques imaginaux est également régulée par l'activation d'EcR. En effet, des mutants dominants négatifs de ce récepteur provoquent un arrêt de la prolifération cellulaire, alors que son activation favorise la transition G1-S en augmentant l'expression de *dMyc* [293, 294].

Si l'ecdysone est capable d'induire la progression du cycle cellulaire dans différents systèmes, il semblerait qu'elle soit également impliquée dans son arrêt. En effet, un traitement à l'ecdysone bloque des lignées cellulaires de moustiques en phase G1 [295], tandis que les cellules S2 de drosophile et des cellules de la teigne du fruit sec, *Plodia interpunctella*, sont bloquées en phase G2 [296, 297]. Cet arrêt en G2 serait causé par une diminution de l'expression de *cycB* [298]. Il semblerait donc que l'ecdysone puisse avoir des rôles opposés sur la régulation du cycle cellulaire suivant le modèle utilisé.

## **4. Mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire**

Comme nous venons de le voir, la croissance d'un tissu est régulée par un ensemble de mécanismes lui permettant d'atteindre une forme et une taille optimales pour assurer sa fonction. Le maintien de ces dernières est fondamental pour la survie de l'individu. Dans cette quatrième partie, les mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire seront détaillés. Ils diffèrent suivant le stade de développement et le type de déséquilibre induit, tel un excès de prolifération ou la perte de cellules.

### **4.1. La réparation des blessures et la régénération**

De nombreux organismes ont la capacité de réparer une structure suite à un dommage entraînant la perte de cellules. Par exemple, l'épiderme humain est capable de cicatriser après une blessure, prévenant par la même la perte de sang et les infections. Néanmoins, une conséquence inévitable de la réparation des tissus chez l'adulte est la formation de fibrose et de cicatrice au niveau du tissu conjonctif réparé. Les traitements utilisés en cas de blessure ont pour but de diminuer le temps de cicatrisation afin de diminuer le risque d'infection. Différentes stratégies ont ainsi été élaborées pour tendre vers une cicatrisation parfaite, c'est-à-dire sans marque.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réparation ou la régénération des tissus endommagés, puis de perfectionner ces traitements, de nombreux modèles d'étude ont été utilisés. Ils peuvent être basés sur des cultures cellulaires [299], sur *C. elegans* [300], des embryons de poulets [301] ou de drosophiles [302]. Il est à noter que les mécanismes identifiés semblent conservés dans l'ensemble des modèles et donc au cours de l'évolution.

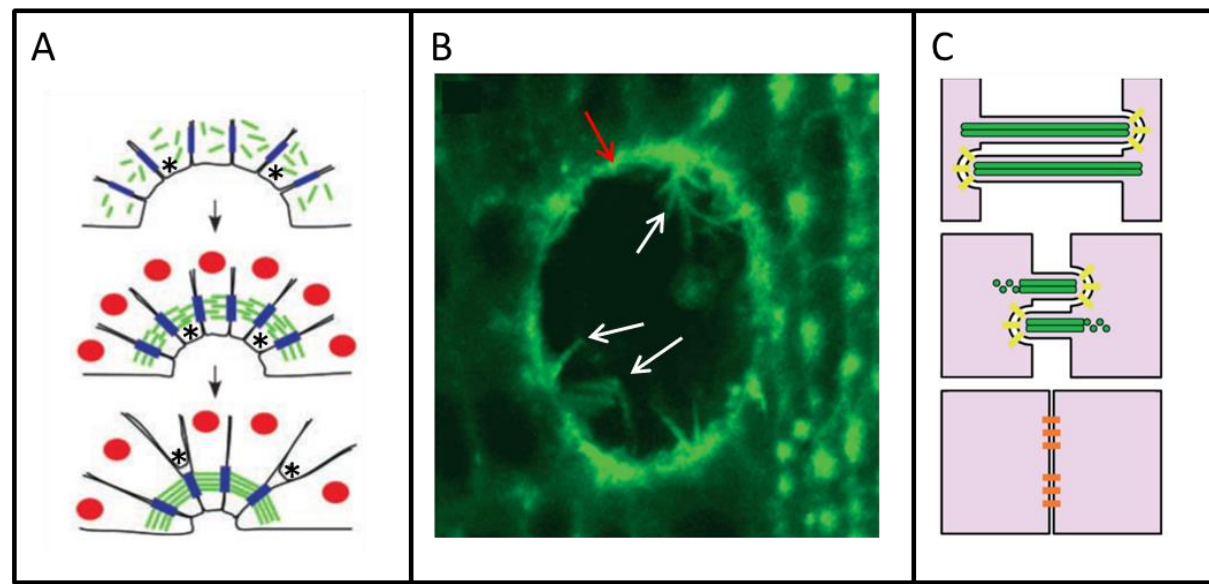
Par ailleurs, les modèles développés sur des embryons présentent la caractéristique de pouvoir réaliser des réparations parfaites sans laisser de cicatrices. La drosophile est donc un bon modèle pour étudier l'ensemble de ces mécanismes.

#### **4.1.1. Réparation des blessures**

Un des modèles couramment utilisé consiste à étudier des événements morphologiques similaires à ceux observés lors d'une blessure. Au cours de l'embryogenèse de la drosophile, la surface de l'embryon se recouvre d'une couche de cellules. Néanmoins, un trou dans l'épithélium subsiste durant une longue période. La fermeture de cet épithélium, qui est connue sous le nom de fermeture dorsale de l'embryon [303], est l'un des événements morphologiques qui sert de modèle de la cicatrisation [304, 305].

Un second modèle consiste à créer mécaniquement une plaie se limitant à quelques cellules à l'aide d'un laser ou d'une fine aiguille au niveau de l'épithélium. Cette ablation de cellules n'induit ni mort cellulaire ni augmentation de la prolifération à proximité de la zone blessée [306], tout comme lors de la fermeture dorsale de l'embryon. Par contre, elle induit une modification morphologique des cellules bordant la blessure. En effet, celles-ci s'allongent et s'orientent de manière à minimiser la quantité de cellules en contact avec la blessure (Figure 26A) [306]. Tout comme dans la fermeture dorsale de l'embryon, l'actine F et la myosine II s'accumulent [307], formant un véritable câble au niveau de la face apical des cellules bordant la blessure [303, 306, 308]. Ce câble d'actomyosine intracellulaire qui entoure la blessure est relié aux cellules voisines au niveau des jonctions adhérentes. La contraction de ce câble va fournir la force nécessaire pour refermer la blessure comme une bourse se ferme par un cordon. Ce mécanisme est donc couramment appelé contractions de l'actine « en cordon de bourse » (Figure 26B). L'organisation du cytosquelette d'actine est classiquement régulée par les petites GTPases et la formation de ce câble est dépendante de la GTPase Rho1 mais indépendante des GTPases Rac1 et Cdc42 (.

Plusieurs études montrent que ce mécanisme n'est pas le seul qui permette la cicatrisation de la blessure puisque l'inhibition de la formation du câble d'actomyosine par la perte de fonction de Rho1 ne fait que ralentir la cicatrisation [306]. De plus, bien que non impliquées dans la formation du câble d'actomyosine, d'autres GTPases sont également impliquées dans cette fermeture. En effet, la fermeture dorsale de l'embryon et la réparation des blessures sont également dépendantes de la formation de lamellipodes et de filopodes au niveau des cellules



**Figure 26 : Réparation des blessures.**

(A) Les cellules bordant une blessure s'allongent et s'orientent de manière à minimiser la quantité de cellules en contact avec la blessure. En effet, suite à ces mouvements cellulaires, les cellules marquées par un astérisque ne seront plus en contact avec la blessure. L'actine est représentée en vert, les jonctions adhérentes en bleu et les noyaux en rouge. Adapté de [305].

(B) Les cellules bordant une plaie au niveau de l'épithélium d'un embryon de drosophile présentent une accumulation d'actine et de myosine formant un câble entourant la blessure (flèche rouge). Des forces de contraction au niveau de ce câble permettent la fermeture en « cordon de bourse ». Les protrusions d'actine (flèches blanches) présentes au niveau des cellules bordant la blessure ont un rôle fondamental lors de la fermeture de la blessure. D'après [309].

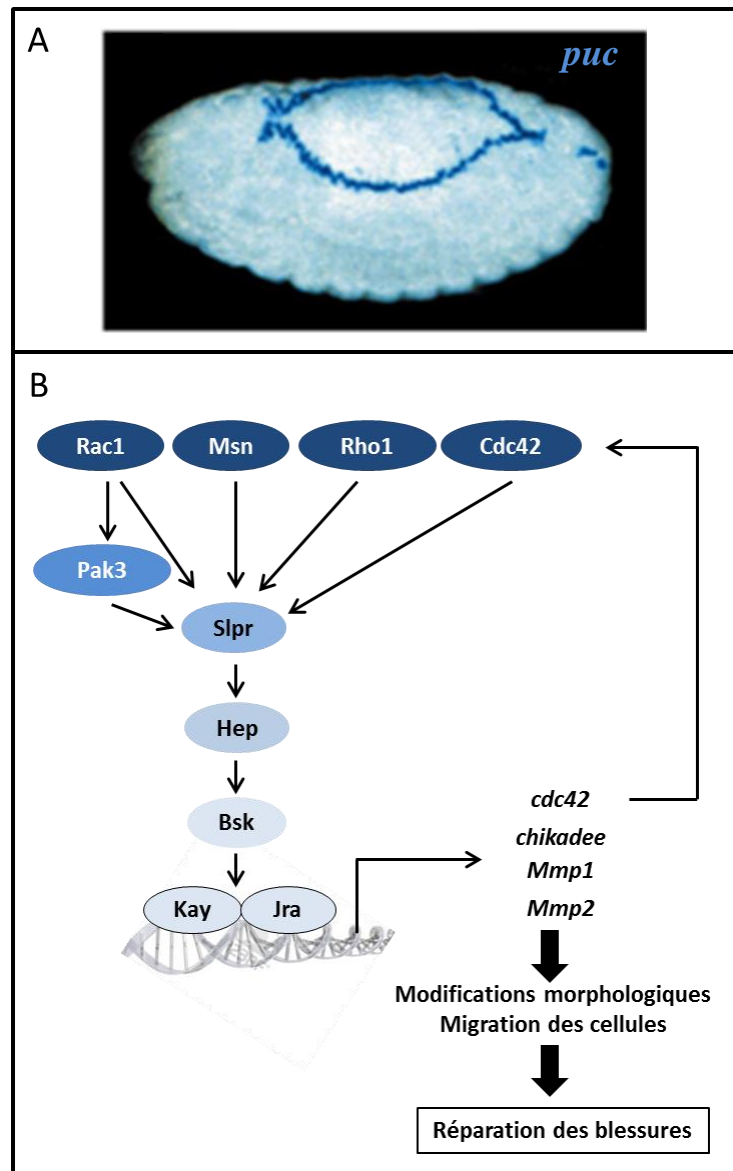
(C) Ces protrusions (cylindre vert) favorisent, en interagissant avec les cellules opposées, le rapprochement terminal et l'adhésion des deux épithéliums par rétraction. Adapté de [305].

épithéliales bordant la « blessure » (Figure 26B) [302, 306]. L'inhibition de la formation de ces protrusions par une perte de fonction de la petite GTPase Cdc42 empêche la suture des épithéliums. Ces extensions membranaires sont deux types de protrusions impliquées dans les mouvements cellulaires et dans l'exploration de l'environnement. Les différences morphologiques et fonctionnelles entre ces deux types de protrusions sont dues aux différences d'organisation du faisceau d'actine en leur sein. Ces extensions membranaires jouent un rôle fondamental dans l'établissement de jonctions entre les cellules situées de part et d'autre de la blessure. Pour cela, elles explorent l'espace laissé vacant par la blessure et, en interagissant avec l'épithélium opposé, elles favorisent le rapprochement terminal et l'adhésion des deux épithéliums (Figure 26C) [302, 306]. Ce mécanisme de réparation favorise la restauration de la continuité de l'épithélium par un mécanisme de ré-épithélialisation. Il nécessite uniquement des modifications morphologiques cellulaires et des forces de contraction et de rétractation permettant des mouvements cellulaires. Il permet de prévenir des infections et de protéger l'organisme contre l'environnement extérieur. Ce mécanisme est également retrouvé après une blessure de l'épithélium recouvrant la larve [310], l'adulte [311] ou au niveau des disques imaginaux [80, 312].

#### **4.1.2. Rôle de la voie JNK dans la réparation des blessures**

La voie JNK prend une part importante dans ce mécanisme de cicatrisation. En effet, dans tous ces modèles, elle est activée dans les cellules bordant la blessure. Contrairement à la fermeture dorsale de l'embryon, où cette voie de signalisation n'est activée que dans la rangée de cellules bordant la blessure (Figure 27A), elle peut être activée jusqu'à une quinzaine de rangées cellulaires dans les autres modèles d'études chez la drosophile [80, 310-312]. La voie JNK reste activée tout au long de la réparation et le nombre de cellules dans lesquelles elle est activée dépend de la taille de la blessure [312].

Son importance a été mise en évidence dans un premier temps dans la fermeture dorsale de l'embryon puis étendue aux autres modèles. Des pertes de fonctions des gènes codant les facteurs de transcription Fra et Jra, la JNK Bsk et la MAP2K Hep [80, 313] inhibent la réparation de ces blessures (Figure 27B). La fermeture dorsale dépend également de la MAP3K Slpr [314, 315] qui est activée par la MAP4K Msn et par la petite GTPase Rac1 [315]. Dans un modèle de blessure de l'épiderme de la larve, la voie JNK est activée par



**Figure 27 : Implication de la voie JNK dans la réparation des blessures et la fermeture dorsale de l'embryon.**

(A) La voie JNK est activée dans les cellules situées à la bordure de l'épithélium lors de la fermeture dorsale de l'embryon comme l'indique l'activation de sa cible transcriptionnelle *puc*. D'après [316]. (B) L'activation du cœur de la voie JNK (Hep/Bsk/Kay/Jra) dépend de la MAP3K Slpr qui peut être activée de différentes façons par des petites GTPases ou par la MAP4K Msn. L'activation de la voie JNK induit l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le remodelage et la migration cellulaire tels que *Mmp1*, *Mmp2*, *chikadee* permettant ainsi la réparation des blessures et la fermeture dorsale de l'embryon.



Rac1, Cdc42 et Rho1 [317]. Dans ce cas, Rac1 pourrait activer la voie JNK par l'intermédiaire de la kinase PAK3 (p21-activated kinase 3) [318].

La voie JNK régule la mise en place des lamellipodes et des filopodes [302] en stimulant l'expression de *cdc42* [319] *via* AP-1, dans une boucle d'amplification puisque Cdc42 est impliquée dans l'activation de la voie JNK dans ce mécanisme [317]. Elle favorise également la mise en place du câble d'actomyosine [80, 307, 317] en modulant, entre autres, la localisation de la myosine [307]. Elle est enfin responsable des modifications de l'organisation cellulaire qui comprend la modification de l'orientation et l'allongement des cellules (Figure 27B) [80, 310, 317].

La voie JNK régulerait une partie de ces modifications par l'intermédiaire des métalloprotéases matricielles (MMP) qui sont impliquées dans la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. En effet, la surexpression de MMP1 induite par l'activation constitutive de la voie JNK accélère le taux de cicatrisation [320]. Les MMP régulent également le remodelage des tissus durant le développement [79, 321]. MMP1 serait requise pour promouvoir le remodelage de la membrane basale nécessaire pour les modifications morphologiques et la migration des cellules bordant la blessure. L'augmentation de MMP1 activerait également la voie MAPK ERK qui pourrait être nécessaire pour induire la mobilité cellulaire [322].

Une autre cible transcriptionnelle de la voie JNK dans la réparation des blessures est le gène *chickadee* qui code l'orthologue de la profiline chez la drosophile. Cette protéine favorise la formation du polymère d'actine et donc la formation du câble d'actine. L'inhibition de son expression induit un défaut dans l'assemblage du câble d'actomyosine et l'établissement des protrusions [323]. MMP2, qui est la seconde MMP de drosophile, est également impliquée dans la réparation des blessures mais son rôle exact dans ce mécanisme n'a pas été décrit [79, 321].

#### **4.1.3. Régénération des disques imaginaux larvaires**

Bien que ces modifications morphologiques permettent la réparation de la blessure, le remplacement des cellules perdues est nécessaire pour que le tissu conserve sa morphologie. Ceci se traduit par l'intercalation de nouvelles structures dérivant de cellules prolifératives présentes autour de la zone endommagée qui forment une structure appelée blastème. Ce mécanisme est couramment appelé régénération tissulaire.

Un certain nombre d'organismes invertébrés, comme les planaires, l'hydre d'eau douce, les ascidies et les échinodermes ont un potentiel régénératif élevé [324]. La capacité de régénération est également bien connue chez la drosophile depuis les années 1970 [325, 326]. En effet, un disque imaginal de drosophile coupé en deux est capable de redonner un disque entier. A l'opposé des cellules des organismes modèles précités, les cellules des disques imaginaires ne sont pas différenciées mais sont déterminées. Ces cellules expriment donc des gènes spécifiques selon leur localisation. La capacité des disques à se régénérer dépend de la région supprimée. En effet, s'il reste dans le tissu endommagé, des cellules localisées au niveau des différentes frontières A/P et D/V, qui correspondent aux centres organisateurs, alors le disque est capable de se régénérer [324].

Une technique couramment utilisée pour étudier ces mécanismes est de réaliser l'ablation d'une partie de la poche du disque d'aile ou de patte et de cultiver le fragment restant dans l'abdomen de mouches adultes. Il est à noter que l'ablation d'une région du disque n'induit pas d'apoptose dans le fragment restant [327]. Ce modèle a permis de mettre en évidence que la régénération a lieu en trois étapes. La première consiste à réparer la blessure pendant une période de 12 à 48 heures. La seconde étape consiste à la formation du blastème, 36 à 48 heures post-fragmentation. La prolifération se limite alors au site de blessure. Enfin, durant la troisième étape le blastème s'accroît et le domaine manquant est reformé. Cette étape s'étale de 48 à 72 heures post-fragmentation [328].

L'augmentation de la prolifération cellulaire a lieu sur plusieurs rangées cellulaires bordant la blessure, permettant une régénération complète du tissu. Contrairement à ce qui a été originellement décrit [329, 330], il n'y a pas uniquement une augmentation de la synthèse d'ADN au niveau du blastème, mais également une augmentation du taux de mitoses [80, 327]. Un blastème se forme au niveau des deux marges bordant la blessure et les deux blastèmes vont jouer un rôle équivalent lors de la régénération du tissu. En effet, ils permettent de maintenir l'identité des nouvelles cellules, conservant ainsi l'organisation selon les axes A/P et D/V. Par exemple, des cellules du blastème du compartiment dorso-postérieur donneront des cellules d'identité dorso-postérieure.

L'initiation de la prolifération régénérative est indépendante de la cicatrisation de la blessure [330] car l'inhibition de la réparation n'empêche pas la formation du blastème. La voie JNK, qui est impliquée dans la réparation de la blessure, jouerait également un rôle important dans la formation du blastème. En effet, son inhibition diminue le nombre de cellules en division au niveau du blastème [312, 327].

La voie Wg, qui est impliquée dans les mécanismes de régénération chez les vertébrés [331], favorise également la régénération des disques imaginaux [332, 333]. Elle serait impliquée dans la formation du blastème [328]. Son expression ubiquitaire, même faible, est suffisante pour induire la formation d'un blastème dans le disque imaginal de patte en absence de blessure [328, 332]. Son effet pourrait être médié par l'expression des gènes *alr* (augmenter of liver regeneration), *rgn* (regeneration) et *Mmp1* [334] au niveau du site de formation du blastème [328]. *rgn* serait impliqué dans la régénération en modulant le temps de formation du blastème, *alr* favoriserait la prolifération des cellules du blastème et MMP1 induirait l'arrêt de la prolifération des cellules hors du blastème [328]. Les voies de signalisation par lesquelles ces gènes régulent la régénération des disques n'ont pas encore été mises en évidence.

Certains tissus comme les disques imaginaux ont donc la capacité de se réparer par cicatrisation et de se régénérer, ce qui permet le maintien de l'homéostasie tissulaire. Par la suite, je vais détailler les mécanismes permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire après une augmentation importante de l'apoptose. Je vais débiter par le mécanisme qui a été le plus étudié jusqu'à présent et qui correspond à la prolifération compensatoire.

## **4.2. La prolifération compensatoire**

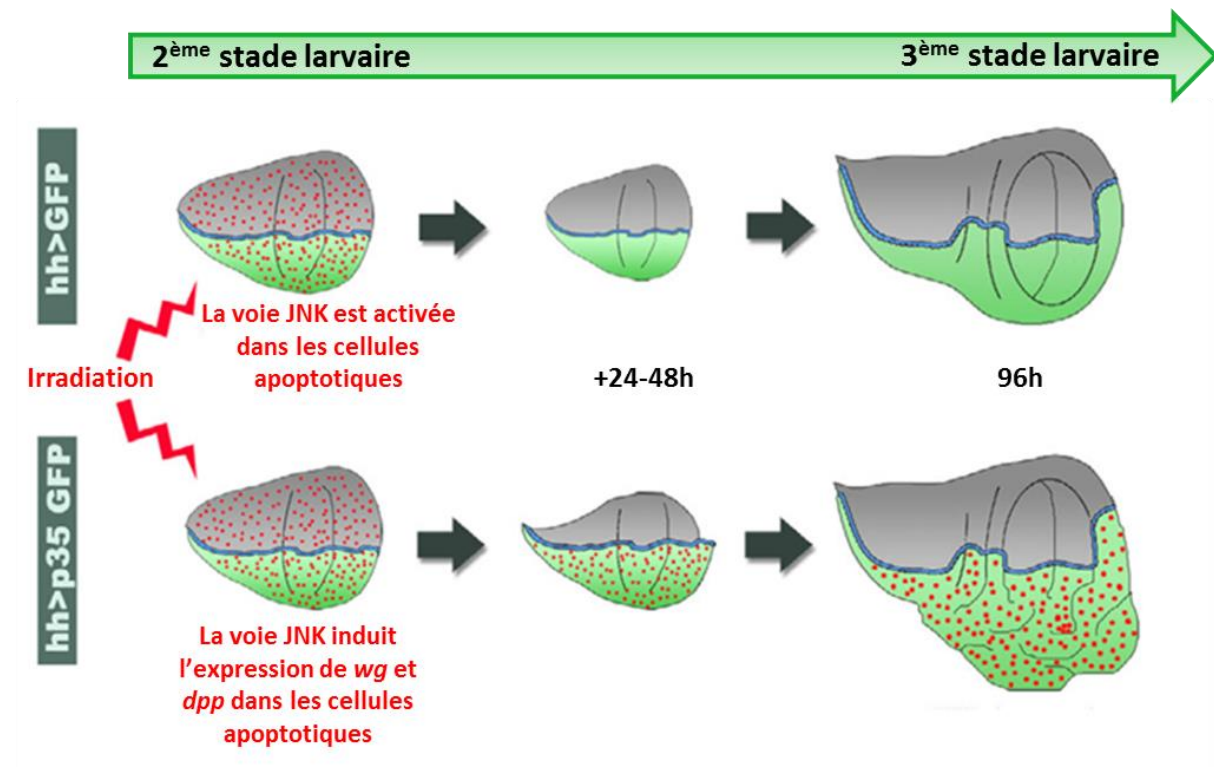
En réponse à une forte induction de l'apoptose dans les disques imaginaux d'aile ou de patte, les cellules survivantes sont capables d'induire une forte réponse proliférative classiquement nommée prolifération compensatoire [325, 335]. Cette augmentation du taux de prolifération des cellules survivantes permet de compenser la perte de cellules. La compréhension de ce mécanisme a connu une évolution importante ces dernières années, bien qu'il ait été mis en évidence dans les années 1970. Il a été découvert dans le disque imaginal d'aile de drosophile qui est couramment utilisé pour étudier les propriétés de cellules apoptotiques. En effet, ce tissu présente peu d'apoptose développementale [336]. L'élimination de 50% des cellules du disque d'aile par irradiation peut conduire au développement d'une aile de forme et de taille normale, ce qui suggère que les cellules survivantes prolifèrent de manière à compenser les cellules éliminées [336, 337]. Différents modèles d'étude ont été établis afin d'étudier les mécanismes mis en place pour compenser la perte de cellules induite par une apoptose non développementale.

#### 4.2.1. Les cellules mort-vivantes en présence de p35

Le modèle le plus couramment utilisé repose sur l'induction de l'apoptose et le blocage de sa réalisation. L'apoptose peut être induite par l'expression d'un gène pro-apoptotique, tel que *hid* ou *rpr*, par la perte de fonction de DIAP1 ou bien encore par une irradiation. La voie d'apoptose est bloquée dans ses étapes tardives par p35, un inhibiteur des caspases originaire du baculovirus [338]. Ce modèle consiste donc à créer des cellules mort-vivantes ou « undead-cells ». Il a permis de mettre en évidence une surprolifération cellulaire non-autonome causée par l'expression autonome des morphogènes *dpp* et *wg* [339, 340]. Comme je l'ai détaillé précédemment, ces derniers agissent comme des mitogènes dans le disque d'aile. Les cellules apoptotiques n'étant pas éliminées, l'expression continue de ces mitogènes aboutit à des aberrations développementales. Des mutations perte de fonction de *dpp* ou de *wg* diminuent cette surprolifération des cellules voisines [339, 341]. L'expression de *dpp* et de *wg* serait régulée par la voie JNK [339, 342] et par p53 qui aurait une fonction indépendamment de son rôle de senseur de dommage à l'ADN [343]. L'activation de cette surprolifération serait dépendante de la voie d'induction de l'apoptose. En effet, suivant les études, elle dépendrait soit de DIAP1 indépendamment de Dronc [339], soit de Dronc en aval de DIAP1 [344], mais serait indépendante de la caspase effectrice DrICE [345].

Ce mécanisme de prolifération compensatoire ne se limite pas qu'aux tissus indifférenciés tels que le disque imaginal d'aile. On le retrouve également dans le disque d'œil, où les mécanismes d'activation vont différer dans les cellules différenciées qui sont des cellules qui sont sorties du cycle cellulaire. Dans ce cas, les morphogènes Dpp et Wg ne sont pas impliqués dans ce processus qui dépend alors de la synthèse du morphogène Hedgehog par les cellules apoptotiques différenciées sous le contrôle des caspases effectrice DrICE et Dcp-1. L'expression de Hh régule la prolifération compensatoire en favorisant la rentrée dans le cycle cellulaire de cellules qui en étaient précédemment sorties [346].

Une étude récente a mis en évidence que les mécanismes induits par les cellules mort-vivantes ne refléteraient pas forcément ce qui se passe au niveau de cellules apoptotiques en absence de p35 (Figure 28). En effet, l'inhibition de l'apoptose dans le domaine postérieur de disques d'aile irradiés induit une invasion du domaine antérieur par des cellules du domaine postérieur, phénomène qui n'est pas observé en absence de p35 [340, 347]. De plus, la prolifération compensatoire induite par les cellules du disque d'aile soumises à des irradiations ne nécessite pas toujours la présence de Dpp et de Wg. En effet, des clones perte



**Figure 28 : Différence de la réponse à l'induction d'une apoptose massive dans le disque imaginal d'aile en fonction de l'expression de *p35* dans un compartiment.**

Après irradiation, la voie JNK est activée dans une grande partie des cellules induisant une apoptose massive (points rouges). En absence d'expression de *p35* (*hh* > *UAS-GFP*, en haut), une prolifération compensatoire indépendante de Wg et de Dpp permet le développement d'un disque de troisième stade larvaire de taille normale à 96h.

Si *p35* est exprimé dans le compartiment postérieur (*hh* > *UAS-p35 UAS-GFP*, en bas), 24h après l'irradiation, les cellules apoptotiques (points rouges) ont disparu à l'exception de celles exprimant *p35* dans le domaine *hedgehog* (vert). La voie JNK est constitutivement activée dans ces cellules mort-vivantes, entraînant l'expression de *wg* et de *dpp*. Ces facteurs sécrétés promeuvent la prolifération des cellules survivantes. L'absence d'élimination de ces dernières conduit à une hyperplasie du disque. Adapté de [348].

de fonction de ces deux gènes recouvrant tout le domaine postérieur du disque d'aile n'induisent pas de déséquilibre entre les compartiments antérieur et postérieur. L'expression dépendante de la voie JNK de *dpp* et de *wg* par les cellules mort-vivantes serait ainsi une conséquence de leur persistance. Il est donc nécessaire de travailler en absence de p35 pour étudier la régulation de la prolifération compensatoire [348].

#### **4.2.2. En absence de p35**

Les modèles actuels sont basés sur l'ablation d'une région du disque par l'expression d'un gène pro-apoptotique. L'ablation partielle de la poche du disque imaginal d'aile par l'expression d'*eiger* sous le contrôle du pilote *rotund* provoque un arrêt de la prolifération dans le notum mais son maintien dans la poche. Ce modèle a permis de mettre en évidence que la prolifération cellulaire au niveau de la poche du disque est régulée par l'augmentation de l'expression de *dMyc* sous contrôle de Wg [349]. Ce dernier serait lui-même induit par la voie JNK [350]. Contrairement à ce qui a été décrit pour les cellules mort-vivantes, *wg* serait essentiellement exprimé, tout comme *dMyc*, dans les cellules mitotiques et non dans les cellules apoptotiques [349].

Dans un second modèle, l'ablation de la poche induite par l'expression de *hid*, entraîne une augmentation de la prolifération, qui n'est plus limitée au voisinage de la zone ayant subi le dommage, mais qui est observée dans la totalité du disque [351]. Une des explications possibles de cette différence serait que cette augmentation de la prolifération serait assez précoce après l'ablation et que la prolifération ait été regardée trop tardivement dans l'étude précédente [349]. De plus, contrairement à l'étude précédente, *wg* ne serait pas impliqué dans cette augmentation de la prolifération [351].

Si le rôle de Wg et Dpp dans l'induction de la prolifération compensatoire en absence de p35 est fortement débattu [349, 351], il semblerait que la voie JNK, qui régule leur expression dans les cellules mort-vivantes, joue également un rôle prépondérant dans l'induction de la prolifération compensatoire en absence de p35. Cette voie est alors activée dans les cellules saines voisines, et non dans les cellules apoptotiques comme en présence de p35 (Figure 29A). En effet, son inhibition dans les cellules apoptotiques n'a pas d'effet sur l'induction de la prolifération compensatoire [351, 352]. La voie JNK activerait la prolifération des cellules saines par l'intermédiaire de Yki, le facteur de transcription de la voie Hippo (Figure 29B) [350]. Cet effet passerait par une phosphorylation de Jub, une

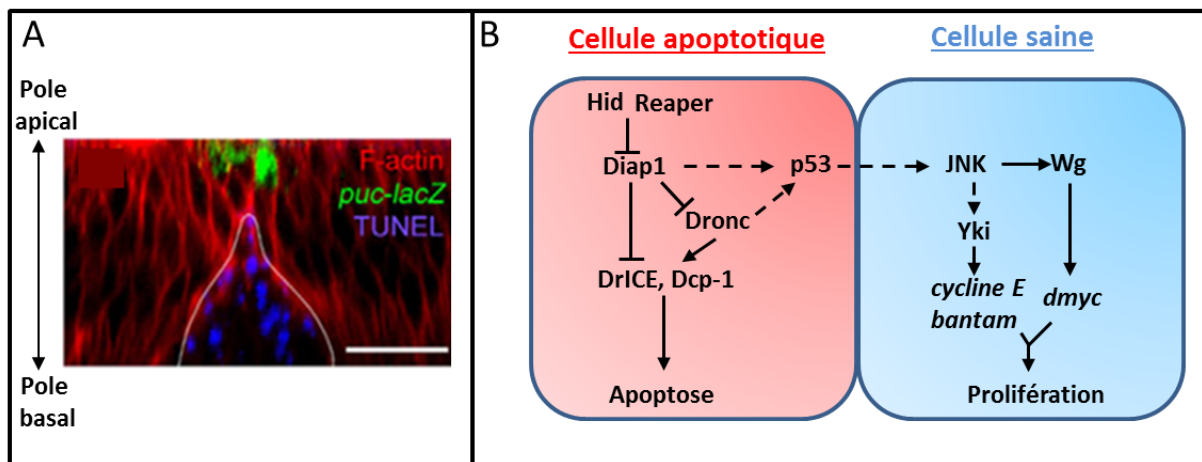
protéine de la famille Ajuba, permettant son interaction avec la kinase Warts. La diminution d'activité de Warts qui en découlerait permettrait la translocation de Yki au noyau et favoriserait l'augmentation de la prolifération [353].

Une étude récente a mis en évidence que l'expression de *p53* dans les cellules apoptotiques serait également impliquée dans l'induction de la prolifération compensatoire en absence de p35. Ce gène code deux isoformes différentes : une forme longue (Dp53) et une forme courte tronquée au niveau de l'extrémité N-terminale (DΔNp53). La forme tronquée favoriserait l'expression dépendante de la voie JNK de *wg* par les cellules prolifératives (Figure 29B) [354]. Les signaux émis par les cellules apoptotiques afin d'induire la prolifération des cellules voisines demeurent à ce jour méconnus.

La prolifération compensatoire n'est pas limitée pas aux arthropodes. Elle a été observée chez d'autres organismes tels que l'hydre, le nématode, le xénope et la souris. Son étude chez ces modèles a mis en évidence la conservation au cours de l'évolution des mécanismes généraux permettant l'augmentation du taux de prolifération en réponse à une mort cellulaire accidentelle. En effet, l'expression de mitogènes de la famille Wnt est également régulée par l'activation d'une voie MAPK (ERK) et de p53 [355-357]. Par ailleurs, les caspases effectrices 3 et 7 régulent également l'induction de la prolifération compensatoire chez la souris [358]. D'autres stratégies, ne reposant pas sur l'augmentation du taux de prolifération mais au contraire sur son arrêt, ont également été conservées au cours de l'évolution pour favoriser le maintien de l'homéostasie tissulaire.

#### **4.3. Arrêt de la prolifération dans les compartiments adjacents.**

Dans de nombreuses études de la prolifération compensatoire ou de la régénération, le taux de prolifération dans les régions adjacentes à la zone endommagée diminue fortement [339, 340, 343, 349, 359]. Par exemple, l'ablation de trois quarts de la poche du disque de patte induit un arrêt de la prolifération dans l'ensemble du disque à l'exception de la zone située à proximité de la zone endommagée qui correspond au blastème [333, 360]. La baisse du taux de prolifération laisserait le temps à la région endommagée de combler le déficit en cellules, contribuant ainsi au maintien d'un organe adulte correctement proportionné. La régulation de ce mécanisme reste encore méconnue.



**Figure 29 : Induction de la prolifération compensatoire en absence d'expression de *p35*.**

(A) Coupe transversale d'un disque imaginal d'aile de drosophile. En absence d'expression de *p35*, la voie JNK est activée (vert) dans les cellules situées en position apicale des cellules apoptotiques (bleu). Adapté de [352]. (B) Schéma représentant le mécanisme d'induction de la prolifération compensatoire en absence d'expression de *p35*. En réponse à un signal apoptotique, la voie JNK serait activée dans les cellules saines afin d'induire leur prolifération en régulant l'expression d'une part de *dmyc* en réponse à l'expression de *wg*, d'autre part de la *cycline E* et de *bantam* via l'activation de Yki.

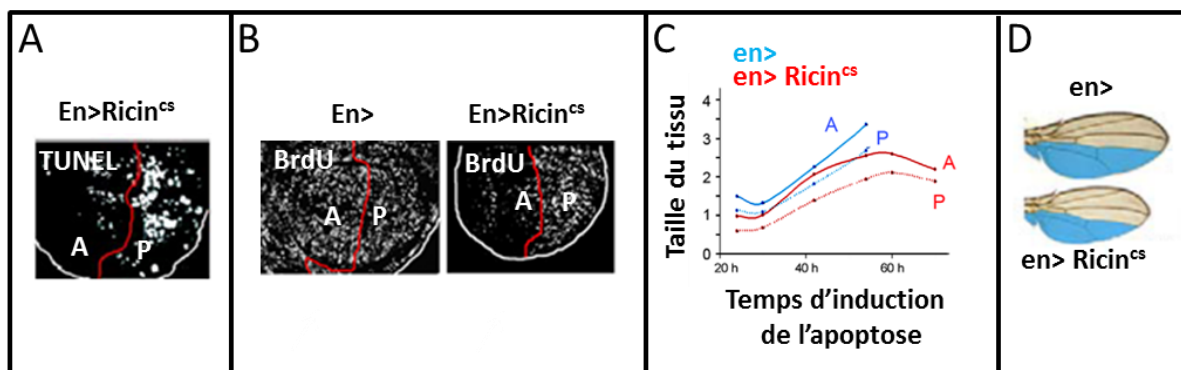


Un arrêt de la prolifération et de la croissance des cellules a également été observé dans les compartiments adjacents au compartiment postérieur ou dorsal dans lequel la mort cellulaire a été induite par une diminution de la traduction. Dans ce modèle, il n'y a pas d'augmentation de la prolifération dans le compartiment touché, en d'autres mots, de prolifération compensatoire (Figure 30A-B). L'arrêt de la prolifération et de la croissance cellulaire dans le compartiment adjacent dépendrait d'une fonction non autonome cellulaire de p53. Cette dernière régulerait l'arrêt de la prolifération par l'intermédiaire de l'activation des caspases effectrices. Le mode de régulation de la croissance cellulaire est pour le moment inconnu [359]. L'arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent à la zone endommagée favoriserait le maintien de l'équilibre de la taille des compartiments du disque (Figure 30C), permettant le développement d'ailes ne présentant pas de défaut structurel majeur (Figure 30D).

Si les mécanismes contrôlant l'arrêt de la prolifération des cellules du compartiment adjacent ne sont pas encore bien connus, cet arrêt semble associé à un retard de développement. Le retard permettrait au disque d'avoir plus de temps pour atteindre sa taille critique et permettrait de coordonner la taille des tissus au sein de l'organisme [361, 362]. La modulation du temps de développement pourrait donc jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

#### **4.4. Retard d'entrée en métamorphose**

Le lien entre le temps de développement et le contrôle de la croissance a été mis en évidence dans des disques imaginaux endommagés, dont la croissance est ralentie ou présentant des tumeurs [341, 343, 349, 362-368]. Dans tous ces cas, les disques imaginaux affectés induisent un retard de l'initiation de la métamorphose. Par exemple, l'ablation de la poche du disque d'aile induit un retard de l'initiation de la métamorphose de 2 à 3 jours (Figure 31A) [369]. Le phénotype des mouches adultes est alors inversement corrélé à la durée du retard de développement (Figure 31B) [349]. Par ailleurs, la quantité de dommages subis par les disques imaginaux est corrélée au retard de l'initiation de la métamorphose [369]. Ainsi, l'inhibition du retard de développement par une ingestion d'ecdysone par les larves empêche la réparation complète des disques imaginaux après irradiation. En effet, les adultes issus des larves ainsi traitées présentent désormais des phénotypes d'échancrure à la marge de l'aile



**Figure 30 : Maintien de l'homéostasie tissulaire par un arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent au compartiment endommagé.**

(A) L'expression du gène codant la toxine Ricine dans le compartiment postérieur du disque d'aile induit de l'apoptose (points blancs). (B) Dans un disque contrôle (photo de gauche), la prolifération cellulaire (points blancs) est uniforme. L'apoptose induite dans le compartiment postérieur (photo de droite) provoque un arrêt de la prolifération dans le compartiment antérieur. (C) Cet arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent favorise le maintien d'une proportionnalité de taille entre les deux compartiments (en rouge). (D) Le maintien de cet équilibre de la taille des compartiments du disque permet de conserver la morphologie de l'aile fonctionnelle (en bas) et donc potentiellement sa fonction. Adaption de [359].

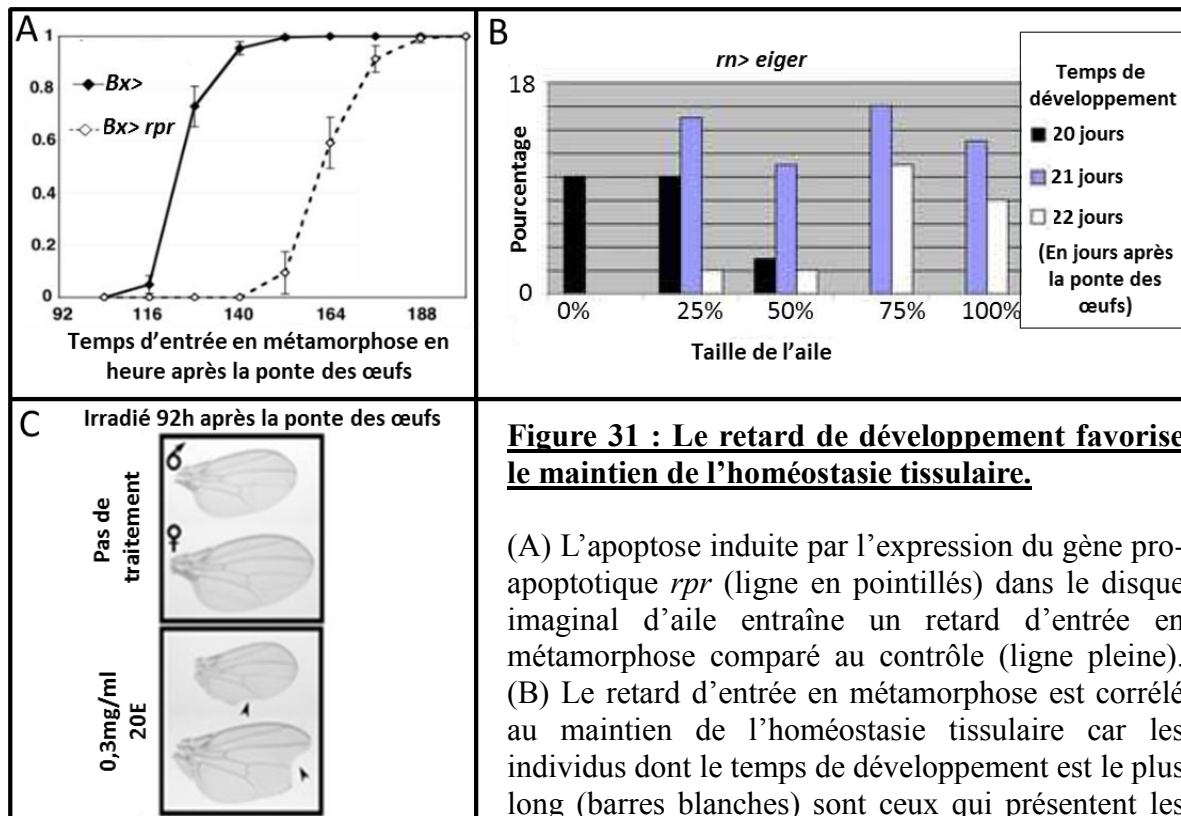
(Figure 31C) [369]. Ces résultats démontrent donc que le retard de développement permet de compenser les dommages observés au niveau des disques imaginaux.

Considérant que la durée moyenne du cycle cellulaire est de 8,5 heures à 25°C [363], un retard d'entrée en métamorphose de 24 heures permet la réalisation d'environ trois divisions cellulaires supplémentaires, soit huit fois plus de cellules. Cette augmentation du nombre de cellules pourrait permettre de compenser la perte de cellules endommagées en absence d'une augmentation du taux de prolifération, comme le montre une étude basée sur l'irradiation de disques imaginaux [370].

Le retard de développement ne dépend pas uniquement de la quantité de dommages subis mais également du moment auquel a lieu le dommage [363, 371]. En effet, des dommages en fin de troisième stade larvaire, c'est-à-dire entre 104 heures et 116 heures à 25°C après la ponte des œufs (l'entrée en métamorphose a lieu en moyenne 120 heures après la ponte des œufs), n'induisent pas de retard de développement [369, 371] et les tissus adulte en résultant présentent des défauts structurels [349, 369, 372]. Par ailleurs, des dommages causés au premier ou au second stade larvaire ne provoquent un retard de développement qu'au troisième stade, ce qui révèle l'existence d'un mécanisme qui retarde spécifiquement l'entrée en métamorphose mais qui ne modifie pas les transitions entre les stades larvaires L1-L2 et L2-L3 [369, 373].

Il est à noter que lorsque la taille critique de la larve est atteinte, le temps d'entrée en métamorphose est déterminé [284]. Un mécanisme identique semble exister à l'échelle des disques imaginaux : lorsque des disques sont parvenus à la taille critique, le temps d'entrée en métamorphose est défini [270]. Les mécanismes qui permettent aux disques de signaler l'atteinte de la taille critique restent à ce jour très peu connus. Différentes stratégies semblent envisageables.

Une première stratégie serait que les disques sont capables de communiquer de façon constitutive leur état de croissance. Ces derniers secrèteraient un signal endocrinien, dans l'hémolymph, qui serait mesuré au niveau d'un tissu. Ce dernier, en intégrant la quantité de signaux produits par l'ensemble des disques imaginaux, déterminerait s'ils ont atteint une taille minimale suffisante pour induire l'entrée en métamorphose. Cette hypothèse placerait alors la glande prothoracique comme un élément majeur de ce mécanisme car elle régule l'entrée en métamorphose. Dans ce cas, le signal qui pourrait faire le lien entre la glande prothoracique et les disques imaginaux pourrait être Dilp2. En effet, Dilp2 est exprimée de façon constitutivement faible dans l'ensemble des disques [276].



**Figure 31 : Le retard de développement favorise le maintien de l'homéostasie tissulaire.**

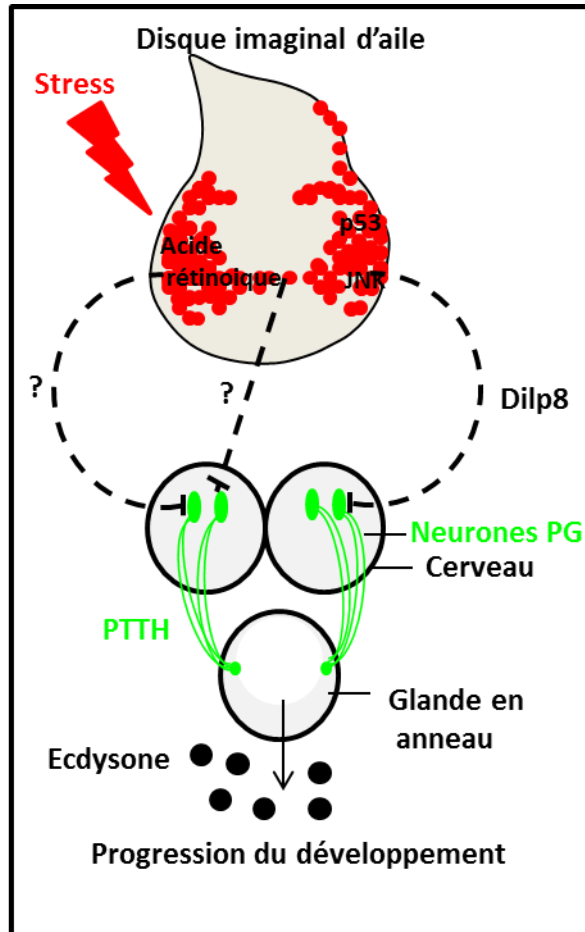
(A) L'apoptose induite par l'expression du gène pro-apoptotique *rpr* (ligne en pointillés) dans le disque imaginal d'aile entraîne un retard d'entrée en métamorphose comparé au contrôle (ligne pleine). (B) Le retard d'entrée en métamorphose est corrélé au maintien de l'homéostasie tissulaire car les individus dont le temps de développement est le plus long (barres blanches) sont ceux qui présentent les phénotypes d'aile les plus faibles après l'ablation de la poche du disque par l'expression d'*eiger* (100%= aile sauvage). (C) L'inhibition du retard de développement par une ingestion d'ecdysone par les larves (bas) empêche une réparation complète du tissu après induction de l'apoptose par irradiation. Les ailes des adultes issus des larves traitées présentent des échancrures (tête de flèches noires) au niveau de la marge de l'aile, par rapport au contrôle (haut). Le retard de l'entrée en métamorphose favorise donc le maintien de l'homéostasie tissulaire. D'après [369] et [349].

La quantité de Dilp2 sécrétée pourrait donc augmenter en fonction du nombre de cellules et cette expression pourrait être corrélée au temps de développement. Ceci serait en accord avec le fait qu'une perte de fonction de Dilp2 induit un retard de développement d'environ 8 heures [374]. De plus, le ralentissement de la croissance au niveau des disques induit une diminution de la croissance de la glande prothoracique [373]. Or, comme je l'ai décrit précédemment, la croissance de la glande prothoracique dépend de la voie InR et donc des Dilp, ce qui pourrait faire de Dilp2 un effecteur majeur de ce mécanisme. Néanmoins, l'ablation totale d'un disque n'induit pas de retard de développement [362]. A l'inverse, un disque dont la taille est augmentée induit un retard de développement [375], ce qui laisse penser que cette première hypothèse n'est pas la bonne.

A l'opposé, les disques pourraient induire un signal qui inhiberait l'entrée en métamorphose. En effet, la transplantation de disques endommagés induit un délai de pupaison chez la pyrale de la farine (*Ephestia kuehniella*) [376]. Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 3.3.1.2), l'entrée en métamorphose est contrôlée au moins en partie par l'inhibition de l'expression, au niveau des neurones PG, du gène *ptth* qui code l'hormone responsable de la synthèse de l'ecdysone au niveau de la glande prothoracique [368, 369, 371, 375].

Cette inhibition de l'expression de *ptth* est régulée, entre autre, par la voie de l'acide rétinoïque [369], qui est également connue chez les vertébrés pour avoir un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire [377, 378] (Figure 32). La voie de l'acide rétinoïque est constituée d'un récepteur nommé Santa-maria qui permet l'entrée du  $\beta$ -carotène à l'intérieur de la cellule. Le  $\beta$ -carotène est alors clivé par NinaB en deux molécules de rétinaldéhyde qui seront transformées sous l'action de déshydrogénases successives en acide rétinoïque [369]. Le récepteur à l'acide rétinoïque peut se lier à l'ADN suite à la fixation de son ligand et ainsi réguler l'expression de ses gènes cibles. Il est possible que l'une des cibles transcriptionnelles, encore inconnue à ce jour, de la voie de l'acide rétinoïque, régule directement ou indirectement la production de PTTH par les neurones PG.

Très récemment, deux élégantes études basées sur des approches différentes [368, 375] ont permis d'identifier un signal qui régule l'expression de *ptth*. Il est responsable du retard de développement induit par des disques endommagés, néoplasiques ou dont la croissance est ralentie. Il s'agit d'un nouveau membre de la famille des Dilp, Dilp8, qui est sécrété par les disques imaginaux afin d'induire un délai de l'entrée en métamorphose (Figure 32). *Dilp8* a une expression basale dans les disques imaginaux, le corps gras et les cellules IPC, mais il ne serait pas sécrété en absence de défaut de croissance. Son expression ectopique est suffisante



**Figure 32 : Régulation de la progression du développement après l'induction d'un défaut de croissance des disques imaginaux.**

Un défaut de la croissance d'un disque imaginal, tel une hyperplasie, de l'apoptose ou un ralentissement de la croissance cellulaire, active p53, la voie de l'acide rétinoïque et la voie JNK. Cette dernière induit l'expression de *dilp8*. Le ou les messagers secondaires induits par l'activation de la voie de l'acide rétinoïque et par p53 n'ont pas encore été identifiés. p53 étant classiquement impliqué dans la signalisation JNK, il est probable que p53 pourrait également réguler l'expression de *dilp8*. Dilp8 et la voie de l'acide rétinoïque inhibe l'expression de Ptth par les neurones PG, retardant ainsi la synthèse de l'ecdysone. Adapté de [369].

pour induire un retard de développement [368, 375]. L'augmentation de l'expression de *Dilp8* au niveau des cellules des disques imaginaux présentant un problème de croissance semble régulée par la voie JNK [375]. En effet, l'expression du gène codant la phosphatase Puc dans de tels disques inhibe l'expression de *Dilp8*. La sécrétion de Dilp8 dans l'hémolymphe retarde l'expression de *ptth* et la synthèse d'ecdysone jusqu'à ce que le disque ait atteint sa taille critique [368, 375], et ce, de manière indépendante des rétinoïdes [368, 375].

Néanmoins, l'action exacte de Dilp8 au niveau du cerveau et de la glande prothoracique est encore inconnue. Elle ne doit pas se limiter à l'inhibition de l'expression de *ptth*. En effet, la surexpression de *dilp8* induit un léger retard de l'expression de *ptth* alors que la synthèse et l'activité de l'ecdysone sont très fortement décalées [375]. Il pourrait donc antagoniser différentes étapes dans la voie de biosynthèse de l'ecdysone. Il pourrait par exemple moduler la sécrétion de PTTH, limiter la formation de sa forme active ou bien réguler l'expression au niveau de la glande prothoracique de *torso* qui code le récepteur de PTTH. La synthèse de l'ecdysone peut également être favorisée par l'activation de la voie de l'insuline au niveau de la glande prothoracique. Bien qu'aucune interaction entre Dilp8 et InR n'ait été mise en évidence, Dilp8 pourrait également inhiber la synthèse de l'ecdysone en antagonisant InR.

La déplétion quasi-totale de Dilp8 corrélée à l'absence d'activation de la voie des rétinoïdes est insuffisante pour inhiber complètement le délai d'entrée en métamorphose [368]. Il existerait donc au moins une troisième voie contrôlant l'entrée en métamorphose.

p53 prend également une part active dans ce processus. En effet, sa perte de fonction inhibe le délai d'entrée en métamorphose provoqué par l'irradiation des tissus larvaires. Cependant, le mode d'action mis en jeu par p53 n'a pas encore été déterminé [370].

En plus de leur rôle respectif dans la prolifération compensatoire, la réparation des tissus et l'arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent, p53 et la voie JNK favorisent donc également le maintien de l'homéostasie tissulaire en induisant un délai de l'entrée en métamorphose.

#### **4.5. L'apoptose compensatoire**

A l'opposé des différents mécanismes qui favorisent le maintien de l'homéostasie tissulaire après un excédent d'apoptose ou d'une trop faible prolifération cellulaire, un excédent de prolifération au sein d'un tissu déclenche également une réponse qui permet d'empêcher une surcroissance anarchique délétère.

De nombreuses mutations qui accélèrent le taux de prolifération cellulaire dans les disques imaginaux provoquent une augmentation de la taille de l'organe adulte correspondant. C'est le cas de mutations touchant les voies Hippo, Ras/EGFR ou Notch, par exemple [379]. Cependant, certaines mutations affectant le cycle cellulaire n'induisent pas forcément d'hypercroissance du tissu touché. En effet, la surexpression des gènes codant la cycline E [380] ou dE2F [381], n'entraînent pas forcément une augmentation de la taille du tissu, que ce soit dans les disques imaginaux d'œil ou d'aile. Il en est de même dans le cas des mutants des gènes de polarité [382] qui induisent une surprolifération. Le maintien de la taille du tissu passe alors par une augmentation de l'apoptose. Cette mort cellulaire dite compensatoire touche, entre autres, les cellules présentant une capacité proliférative aberrante [380, 382, 383]. L'absence de cette apoptose compensatoire serait responsable de l'induction de tumeurs néoplasiques chez les mammifères [384, 385].

L'élimination de cellules surprolifératives peut être expliquée par le fait qu'une augmentation de la cycline E induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle de dE2F1 qui régule l'expression des gènes pro-apoptotiques *rpr* et *hid* [386]. De plus, des cellules présentant une activation constitutive de la voie Dpp, résultant de l'expression d'une forme activée de son récepteur Thickveins ou des modifications d'expression des gènes de polarité, peuvent être éliminées par une activation autonome de l'expression de *rpr* et *hid* dépendante de la voie JNK dans ces mêmes cellules [382, 383].

Les cellules surnuméraires peuvent également être éliminées par une compétition pour des facteurs de survie. En effet, dans le cas où un facteur de survie est en quantité limitante, les cellules présentant une croissance hyperplasique ne reçoivent pas toutes ce facteur et peuvent alors être éliminées. Ce phénomène n'est alors pas spécifique des cellules présentant une capacité proliférative aberrante mais touche l'ensemble des cellules du tissu. Par exemple, la voie EGFR/Ras, qui est impliquée dans la régulation de la taille des tissus, peut contrôler ce mécanisme [387, 388]. En effet, une compétition pour les ligands de cette voie peut être à l'origine de l'apoptose compensatoire observée au niveau de tissus présentant un excès de prolifération cellulaire [380].





## **I. Introduction**

## **II. Résultats**

## **III. Discussion**

## **IV. Matériels et méthodes**

## **V. Références bibliographiques**



## 1. Article 1

Le RE joue un rôle majeur dans la conformation protéique. Une accumulation de protéines mal-conformées dans le RE peut conduire à un stress qui peut être résolu par l'UPR. Dans le cas d'un stress chronique du RE, l'UPR est connue pour induire de la MCP. Les mécanismes découlant de l'UPR pour induire de l'apoptose sont encore mal connus chez la drosophile. Différents mécanismes favorisant le maintien de l'homéostasie tissulaire en réponse à l'apoptose ont été conservés au cours de l'évolution. Les mécanismes mis en jeu en réponse à un stress du RE n'ont pas encore été étudiés chez la drosophile.

Jusqu'à présent, la rétinite pigmentaire autosomale dominante était l'unique modèle qui permettait de mieux comprendre les conséquences d'un stress fort et chronique du RE chez la drosophile. Nous avons validé que la surexpression de la préséniline provoque un stress chronique du RE chez la drosophile comme cela a été précédemment décrit en cellules de mammifères. Dans cet article, nous avons démontré que la voie PERK de l'UPR joue un rôle fondamental dans l'homéostasie tissulaire. Nous avons montré que cette voie est induite en réponse à un stress du RE induit par la surexpression de la préséniline, ce qui aboutit à une activité janiforme d'ATF4. D'une part, ATF4 promeut l'apoptose dépendante des caspases en réprimant l'expression de *diap1*. D'autre part, ATF4 favorise le maintien de l'homéostasie tissulaire par l'activation d'une voie Rac1/Slipper/JNK qui aboutit à l'expression de *dilp8* et à un retard de développement permettant la compensation des cellules éliminées.

Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'article suivant : "The PERK/ATF4 branch of the Unfolded Pathway Response regulates a Dilp8-dependent developmental delay favoring tissue regeneration through the Rac1/Slpr/JNK pathway in *Drosophila melanogaster*".

## The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model

Y Demay<sup>1</sup>, J Perochon<sup>1</sup>, S Szuplewski<sup>1</sup>, B Mignotte<sup>1</sup> and S Gaumer<sup>\*,1</sup>

The endoplasmic reticulum (ER) has a major role in protein folding. The accumulation of unfolded proteins in the ER induces a stress, which can be resolved by the unfolded protein response (UPR). Chronicity of ER stress leads to UPR-induced apoptosis and in turn to an unbalance of tissue homeostasis. Although ER stress-dependent apoptosis is observed in a great number of devastating human diseases, how cells activate apoptosis and promote tissue homeostasis after chronic ER stress remains poorly understood. Here, using the *Drosophila* wing imaginal disc as a model system, we validated that *Presenilin* overexpression induces chronic ER stress *in vivo*. We observed, in this novel model of chronic ER-stress, a PERK/ATF4-dependent apoptosis requiring downregulation of the antiapoptotic *diap1* gene. PERK/ATF4 also activated the JNK pathway through Rac1 and Slpr activation in apoptotic cells, leading to the expression of *Dilp8*. This insulin-like peptide caused a developmental delay, which partially allowed the replacement of apoptotic cells. Thanks to a novel chronic ER stress model, these results establish a new pathway that both participates in tissue homeostasis and triggers apoptosis through an original regulation.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1452; doi:10.1038/cddis.2014.403; published online 9 October 2014

Protein folding is a major role of the endoplasmic reticulum (ER) that can be challenged by modification of calcium homeostasis, elevated protein synthesis, glucose deprivation, hypoxia and altered protein glycosylation, leading to unfolded or misfolded protein accumulation in the ER. If this accumulation exceeds the folding capacity of chaperones, ER-stress is induced, triggering an adaptive response known as the unfolded protein response (UPR) to resolve the stress or eliminate the cell.<sup>1,2</sup> Unresolved ER stress-induced apoptosis is observed in a great number of devastating diseases including neurodegenerative and renal diseases, diabetes and atherosclerosis.<sup>3</sup> Three principal arms of the UPR have been identified and are particularly well characterized in mammals.<sup>4</sup> Each branch is regulated by a different sensor transmembrane protein, that is, IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), PERK (double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR) – like ER Kinase) or ATF6 (Activating Transcription Factor 6) – which senses unfolded protein accumulation and leads to the transcriptional activation of genes involved in the UPR. All three sensors of the UPR are conserved, though ATF6 has not yet been linked to the UPR in *Drosophila*.<sup>5–7</sup> How cells activate apoptosis after a chronic ER stress remains poorly understood. This accidental programmed cell death can lead to an unbalance of tissue homeostasis. Surprisingly,

the UPR has never been shown to play a role in tissue homeostasis after ER stress-mediated cell death.

Well-known strategies that allow tissue homeostasis in *Drosophila* wing imaginal discs are compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation.<sup>8</sup> Tissue homeostasis depends on the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway that is activated either in apoptotic or in proliferating cells according to the apoptotic stimuli.<sup>9–11</sup> Both the mechanism of activation and the role of this pathway remain unclear. Indeed, the JNK signaling has been reported to be controlled by either *Drosophila* inhibitor of apoptosis (DIAP1) or the initiator caspase Dronc.<sup>12–14</sup> Nevertheless, the JNK pathway components that would be targets of DIAP1 or Dronc remain unidentified. In *Drosophila* as in mammals, the transcription factor that represents the last component of this pathway, dAP-1, is a dimer of Jra and Kay, which are homologous to Jun and Fos.<sup>15</sup> It is activated through a cascade of phosphorylations. Although three JNKs exist in mammals, Bsk is the only one in *Drosophila*. Similarly, the complexity of the pathway is lower in dipterans than in mammals with two JNKKs, six JNKKKs and many regulators of the JNKKKs described in *Drosophila*.<sup>16,17</sup> The literature supports the idea that signaling specificity could be driven by the JNKKK and by the combination of activated kinases.<sup>18</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, EA4589, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la Source de la Bièvre, Montigny-Le Bretonneux, France

\*Corresponding author: S Gaumer, Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, Université Versailles-St-Quentin-en-Yvelines, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 2 avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France. Tel: +33 1 70 42 94 17; Fax: +33 1 70 42 95 03, E-mail: sebastien.gaumer@uvsq.fr

**Abbreviations:** 20E, 20-Hydroxyecdysone; ADRP, autosomal dominant retinitis pigmentosa; AED, after egg deposition; ATF6, activating transcription factor 6; Bsk, Basket; DIAP1, *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1; Dilp8, *Drosophila* insulin-like peptide 8; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GADD34, growth arrest and DNA damage-inducible 34; ER, endoplasmic reticulum; Hep, Hemipterous; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; JNKKK, c-Jun N-terminal kinase kinase kinase; MMP1, matrix metalloproteinase; Msn, Misshapen; PERK, double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase; PH3, phospho-histone H3; PSN, presenilin; Puc, Puckered; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; UPR, unfolded protein response; vg, vestigial; XBP1, X-box binding protein 1  
 Received 24.1.14; revised 15.8.14; accepted 18.8.14; Edited by E Baehrecke

The JNK pathway has also been identified as mediating developmental delay by controlling *Drosophila insulin-like peptide 8* (*Dilp8*) expression.<sup>19</sup> Previous studies have demonstrated that damaged imaginal discs delay the onset of metamorphosis, thus permitting tissue regeneration.<sup>20–22</sup> This developmental delay is the result of a depletion of the Prothoracicotropic hormone (Pth), a neuropeptide which promotes the release of the steroid hormone ecdysone that regulates developmental transitions in ecdysozoans such as *Drosophila*. *Dilp8* and retinoids have been identified as secreted signals produced by damaged discs to promote *ptth* transcription inhibition.<sup>19,22,23</sup>

Although numerous studies have shown that ER stress can be induced by various stimuli, ER stress-induced cell death has only been studied once in *Drosophila*. This recent work showed that a strong chronic ER stress induces apoptosis in the eye imaginal discs of *Drosophila* thanks to a CDK5/MEKK1/JNK signaling pathway.<sup>5,24</sup> This model of ER-induced apoptosis relies on a *rhodopsin-1* mutant allele mimicking autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP). The *Presenilin* gene encodes an eight to nine-pass transmembrane protein best described to function as the catalytic subunit of the  $\gamma$ -secretase multiprotein complex after an endoproteolytic processing, but also as a regulator of calcium flux in the ER. It has been previously shown that *Presenilin* overexpression could modify calcium homeostasis in *Drosophila* wing discs<sup>25</sup> and in cultured mammalian cells.<sup>26</sup> This expression induces ER stress in mammalian cells. Full-length *Presenilin* is primarily located on the ER membrane.<sup>27,28</sup> The overexpression of mammalian *Presenilin* in cultured cells induced the accumulation in the ER membrane of *Psn* with unmodified catalytic activity.<sup>29,30</sup> Therefore, we hypothesized that the overexpression of the *Drosophila Presenilin* gene (*Psn*) could be an appropriate model to induce ER stress in this multicellular organism.

In this study, we validate that *Psn* overexpression in wing imaginal discs induces an ER stress and we show that this ER stress triggers both cell death and a regulation of tissue homeostasis. Indeed, a consequence of this overexpression is the induction of a PERK-dependent apoptosis through the activation of the transcription factor ATF4 that downregulates the antiapoptotic *diap1* gene. This ER stress-induced cell death does not induce apoptosis-induced proliferation. ATF4 also activates the JNK pathway through Rac1 and Slpr activation in apoptotic cells. Interestingly, the JNK pathway does not control cell death in this model, but upregulates *Dilp8*, which participates in tissue homeostasis maintenance by controlling the developmental clock. In summary, we present a novel *in vivo* model of chronic ER stress that greatly differs from the previously established ER stress model and we show that the PERK/ATF4 branch of the UPR can trigger a developmental delay favoring tissue regeneration through the Rac1/Slpr/JNK pathway in *Drosophila* wing imaginal discs.

## Results

**Overexpression of *Presenilin* leads to both ER stress and PERK/ATF4-dependent cell death.** To test if the

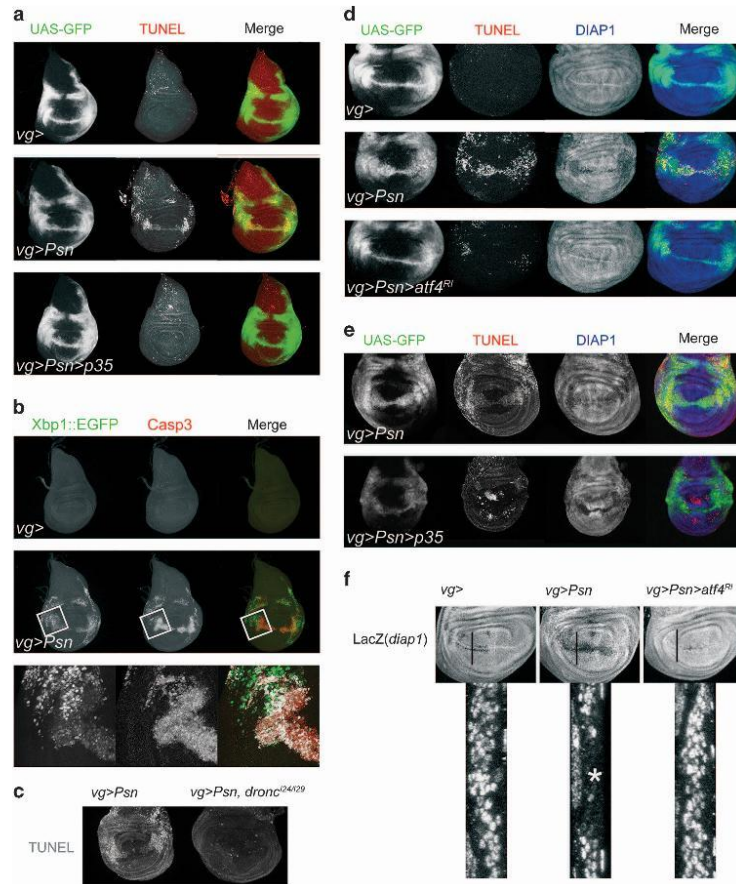
overexpression of *Psn* could be an appropriate model to induce ER stress in *Drosophila*, this gene was overexpressed in part of the *vestigial* (*vg*)-expression domain, which covers the wing-pouch dorsoventral boundary (i.e., the cells corresponding to the adult wing margin) and a part of the hinge and notum, thanks to the *GAL4-UAS* system (Figure 1a, top panel).<sup>31</sup> *Psn* overexpression in this domain led to a notched-wing phenotype of variable expressivity (Supplementary Figure S1A). As *Psn* is involved in the Notch pathway, this adult phenotype could suggest that *Psn* overexpression inhibits the Notch pathway. However, consistent with the data indicating that *Psn* overexpression does not affect *Psn* catalytic activity,<sup>29,30</sup> *Psn* overexpression and Notch depletion induced different phenotypes in third-instar wing imaginal discs. Notch depletion by using an RNAi transgene induced a complete extinction of *Wg* expression on the dorsoventral boundary that was not observed in discs overexpressing *Psn*. Conversely, *Psn* overexpression induced apoptosis, which was not observed upon Notch depletion (Supplementary Figure S1B).

Overexpression of *Psn* triggered ER stress and activated the IRE1 branch of the UPR (Figure 1b), as reported by an *xbp1::EGFP* (enhanced green fluorescent protein) reporter, which allows EGFP protein synthesis only when ER stress stimulates IRE1-dependent XBP1 mRNA splicing.<sup>32</sup> Cells expressing *xbp1::EGFP* were dying as assayed by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Figure 1a) and an anti-activated caspase-3 labeling that reveals *Dronc* activity<sup>33</sup> (Figure 1b). Moreover, expression of the caspase inhibitor baculovirus protein p35 and *dronc* loss-of-function inhibited ER stress-induced cell death (Figures 1a and c). These observations show that *Psn* overexpression induces both ER stress- and *Dronc*-dependent cell death.

To determine if this apoptosis depends on ER stress, we tested whether affecting the IRE1 and PERK branches of UPR could modulate it. Depleting components of the IRE1 branch (XBP1 or IRE1) by using efficacious RNAi transgenes did not modify TUNEL staining (data not shown and Supplementary Figure S2A), suggesting that this branch is not the main inducer of the apoptosis. Depletion of GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34), the phosphatase that negatively regulates PERK activity,<sup>34</sup> increased the cell death level specifically in *Psn*-overexpressing discs (Supplementary Figure S2B and data not shown). Conversely, TUNEL staining was strongly decreased upon depletion of either PERK (Supplementary Figure S2B) or its effector, ATF4 (Figure 1d). These results seemed specific and were not due to GAL4 titration as numerous transgenes inserted at the same locus revealed no effect or opposite effects to PERK and ATF4 depleting transgenes. Therefore, *Psn* overexpression triggers an ER stress-induced cell death that is mainly ATF4 dependent.

To better characterize the ER stress-induced cell death pathway, we focused on DIAP1, the major regulator of caspases in *Drosophila*. The DIAP1 protein level appeared to be decreased in the *vg* domain labeled by GFP (Figure 1d). Depletion of ATF4 was sufficient to re-establish a normal level of DIAP1 (Figure 1d). To rule out that this DIAP1 recovery was due to the reduction of the apoptosis observed in ATF4

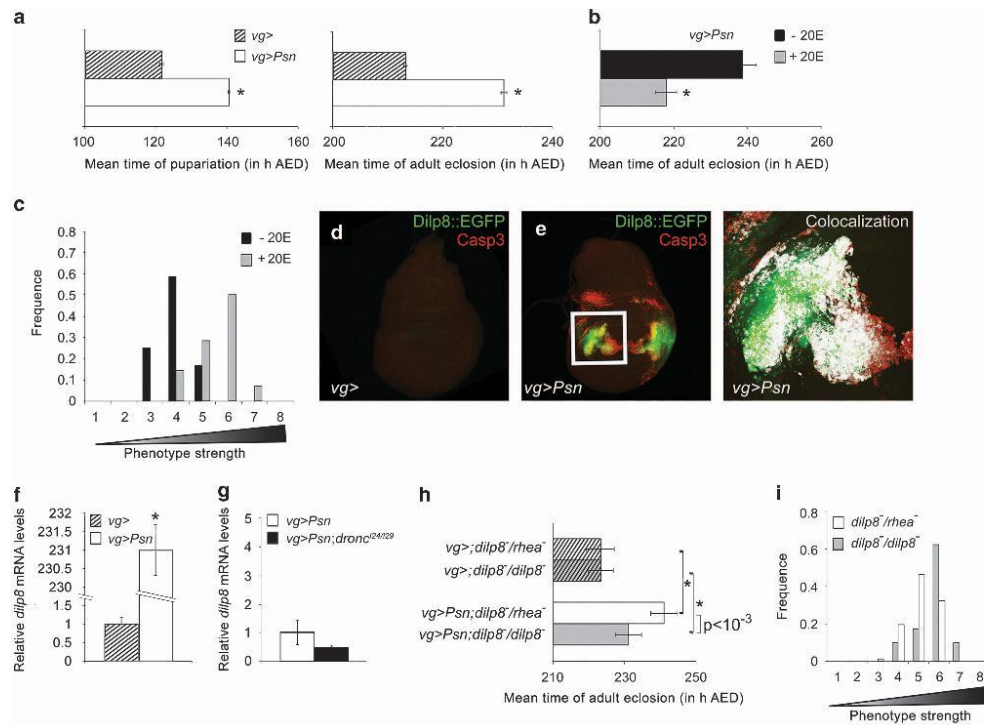




**Figure 1** The PERK/ATF4 pathway is responsible for *Psn* overexpression-induced loss of DIAP1 and apoptosis. (a) Third-instar imaginal wing discs with the *Psn*-expressing domain detected thanks to GFP (green) and TUNEL staining (red) to detect apoptosis. Genotypes are *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (middle) and *UAS-p35/+; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (bottom). (b) Third-instar imaginal wing discs carrying an *xbp1::EGFP* reporter transgene (green) to detect ER stress and immunostained with an anti-activated Caspase 3 staining (red) to detect apoptosis. Genotypes are *vg-GAL4/+; xbp1::EGFP/+* (top row) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; xbp1::EGFP/+* (middle row). Bottom row images are enlargement of boxed regions. Colocalization between anti-activated Caspase 3 staining and Irf1 activity reporter is highlighted in white thanks to the ImageJ Colocalization plugin in the merge enlargement. Note that developmental apoptosis is only observed in the notum (top). (c) TUNEL staining of *Psn*-expressing third-instar imaginal wing discs in the absence or presence of *dronc* mutations. Genotypes are *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (left) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dronc<sup>24</sup>/dronc<sup>29</sup>* (right). (d, e) Third-instar imaginal wing discs with the *Psn*-expressing domain detected thanks to GFP (green), TUNEL stained (red) to detect apoptosis and immunostained with an anti-DIAP1 antibody (blue). (d) Genotypes are *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (middle) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/ATF4-RNAi* (bottom). (e) Genotypes are *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-nGFP; UAS-EGFP/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-nGFP; UAS-p35/+* (bottom). (f) Anti- $\beta$ -Galactosidase staining to detect *diap1<sup>5C8</sup>* reporter expression in *vg-GAL4/+; diap1<sup>5C8</sup>/+* (left column) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1<sup>5C8</sup>/+* (center); and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1<sup>5C8</sup>/UAS-atf4-RNAi* (right column) third-instar wing imaginal discs. The black lines correspond to the projection of the corresponding enlarged transverse XZ sections shown under disk images. Enlarge areas are oriented with their basal side to the left. The asterisk indicates the *diap1* expression reduction (center).

depletion condition, we inhibited ER stress-induced apoptosis by expressing p35. The decrease of DIAP1 level was still observed (Figure 1e). A GAL4 titration effect could also be ruled out as the number of UAS transgenes did not affect the results. These data indicate a control of DIAP1 by the PERK/ATF4 branch of the UPR.

To test the existence of a *diap1* transcriptional regulation, we used a *PlacZ* enhancer-trap insertion that monitors *diap1* transcription.<sup>35</sup> We observed a decrease of anti- $\beta$ -Galactosidase staining in the ER-stressed domain, which was restored by ATF4 depletion (Figure 1f), demonstrating that ATF4 negatively regulates *diap1* transcription after ER stress.



**Figure 2** Dilp8-induced developmental delay favors tissue homeostasis after ER stress. (a) Effects of *Psn* overexpression on pupariation and adult eclosion timing. Hatched bar (*vg-GAL4/+*) and open bar (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*) represent mean time in hours AED of pupariation (left) or adult eclosion (right). Error bars represent the S.E. of the mean. Asterisks indicate a significant difference with the control (Left:  $n = 4$ ,  $P < 10^{-5}$ , ANOVA). (Right:  $n = 6$ ,  $P < 10^{-7}$ , ANOVA). (b) Effects of 20E food supplementation of 92 h AED old *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* larvae on adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. of three independent experiments (asterisk:  $P < 5\%$ , ANOVA). (c) Distribution of notched-wing phenotypes after 20E supplementation (gray bars) or not (black bars) according to their strength in a representative experiment ( $n = 3$ ,  $P < 5\%$ , ANOVA). (d, e) Third-instar wing imaginal discs carrying Dilp8::EGFP (green) and immunostained with an antiactivated caspase 3 antibody (red). Genotypes are *vg-GAL4/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (d) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (e). The enlargement of the boxed area in e, shows signal colocalization highlighted in white thanks to the ImageJ Colocalization plugin. (f, g) *dilp8* RNA levels measured by quantitative reverse PCR. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. RNA was extracted from control (*vg-GAL4/+*, hatched bar, (f) or ER stressed (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*, open bar, (f and g) or ER-stressed *dronc* mutant (*vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dronc<sup>24/29</sup>*, black bar, (g) wing imaginal discs. The asterisk indicates a significant difference with the control ( $P < 10^{-4}$ , Student's t-test). (h) Effects of *dilp8* homozygous mutation (*dilp8<sup>M100727</sup>/dilp8<sup>M100727</sup>*, gray bars) compared with *dilp8* heterozygosity (*dilp8<sup>M100727</sup>/rhea<sup>M100296</sup>*, white bars) on adult eclosion of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) and *vg-GAL4/+* (hatched bars) on mean time of adult eclosion. The *rhea<sup>M100296</sup>* strain is commonly used as the control for *dilp8<sup>M100727</sup>* genetic background.<sup>23</sup> Asterisks indicate significant difference from the corresponding control that does not express *Psn* ( $P < 10^{-4}$ , ANOVA). Error bars represent the S.E.M. of six independent experiments. (i) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/rhea<sup>M100296</sup>* flies (open bars) ( $n = 3$ ,  $P < 10^{-6}$ , ANOVA).

**ER stress-induced cell death does not induce proliferation but causes a general *Dilp8*-dependent developmental delay.** Previous studies have demonstrated that compensatory or apoptosis-induced proliferation could be activated in damaged imaginal discs to maintain tissue homeostasis.<sup>10,11,36–39</sup> We did not observe any difference in the number of mitotic cells labeled by an anti-Phospho-Histone H3 (PH3) immunostaining when compared with control discs (Supplementary Figure S3). Thus, ER stress-induced apoptosis does not seem to increase the cell proliferation rate in the surrounding tissue.

Damages to an imaginal disc can extend the larval development to allow coordination of tissue growth and

regeneration within the organism.<sup>22</sup> Indeed, *Psn* overexpression in the *vg* domain exhibited a 20-h delay before pupariation and adult eclosion (Figure 2a). To determine if this developmental delay participates to tissue homeostasis, we shortened the third larval stage by transferring larvae at 92 h after egg deposition (AED) to food supplemented with 20-Hydroxyecdysone (20E), which is the active form of the steroid hormone that promotes the 120 h AED transition from the larval to the pupal stage.<sup>40</sup> This treatment suppressed the ER stress-induced delay of adult eclosion (Figure 2b) and aggravated the notched-wing phenotypes that result from the ER stress (Figure 2c), showing that the developmental delay participates to tissue homeostasis. Therefore, the



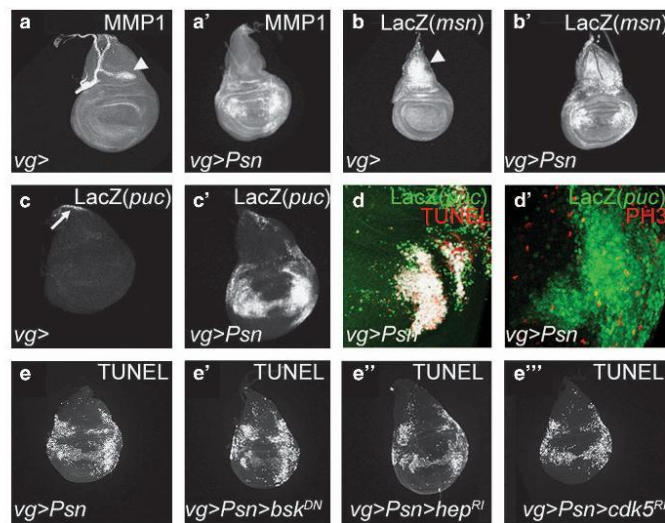
developmental delay favors regeneration after an ER stress in the wing imaginal disc.

Recently, *dilp8* expression has been reported to induce developmental delay in challenged imaginal discs.<sup>19,23</sup> Indeed, accumulation of EGFP, reporting *dilp8* expression thanks to *dilp8*<sup>M100727</sup>,<sup>23</sup> was observed in cells in which caspases were activated (Figures 2d and e) and *dilp8* mRNA was increased by 230-fold in ER stressed wing imaginal discs when compared with unstressed wing discs (Figure 2f). This increase was not significantly modified in *dronec* mutant wing imaginal discs (Figure 2g,  $P=27\%$ , paired t-test), suggesting that the caspase activation is not the major control of *dilp8* expression. A significant decrease of the adult eclosion delay (Figure 2h) as well as a shift toward stronger notched-wing phenotypes (Figure 2i) were observed in *dilp8*<sup>M100727</sup> homozygous mutants in which *dilp8* mRNA levels are strongly reduced.<sup>23</sup> Altogether, these results indicate that Dilp8 is a major contributor to both developmental delay and tissue homeostasis after ER stress that is not directly controlled by caspase activation.

**The JNK pathway activation in apoptotic cells depends on PERK/ATF4 and controls a developmental delay.** The JNK signaling has been previously reported to regulate *dilp8* expression but also to be activated by ER stress-induced cell death in the *Drosophila* model of ADPR.<sup>5,19</sup> We also observed a JNK pathway activation after ER stress induction, thanks to the accumulation of the matrix metalloproteinase 1 (MMP1;

Figures 3a and a'), as well as the expression of *PlacZ* enhancer traps that report the expression of downstream effectors of the JNK pathway, that is, *misshapen* (*msn*; Figures 3b and b') and *puckered* (*puc*; Figures 3c and c').<sup>41</sup> *puc-lacZ* colocalized with TUNEL (Figure 3d) labeling but not with an anti-PH3 staining (Figure 3d'). Similar results were found with *msn-lacZ* (Supplementary Figure S4). Therefore, the JNK signaling is not activated in proliferating cells in response to the ER stress but in apoptotic cells.

We thus asked whether the ER stress-induced apoptosis was JNK dependent. To address this question, we checked whether the inhibition of the JNK signaling was able to modify ER stress-induced cell death. Neither the expression of a dominant negative form of the JNK Basket (*Bsk*<sup>DN</sup>) nor the RNAi-mediated depletion of the *Drosophila* JNKK MMK7 homolog, Hemipterous (*Hep*), had any obvious effect on apoptosis (Figures 3e and e"). The interfering RNA was verified for its efficacy on Eiger-induced cell death and was validated by Marchal *et al.*<sup>42</sup> This could suggest that our model of ER stress differs from the Retinitis Pigmentosa model, in which apoptosis induction involves a CDK5-dependent activation of JNK signaling.<sup>5</sup> Confirming our hypothesis, *CDK5* depletion did not modify the ER stress-induced cell death triggered by *Psn* overexpression (Figure 3e"). These results indicate that, although activated, the JNK pathway does not regulate ER stress-induced apoptosis in our model of ER stress.



**Figure 3** *Psn* overexpression induces a JNK pathway-independent apoptosis. (a, a') Anti-MMP1 staining in *vg-GAL4/+* (a) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (a') third-instar wing imaginal discs. (b–c) Anti- $\beta$ -Galactosidase staining to detect the expression of *msn* (b) or *puc-lacZ* (c, d) reporters in *vg-GAL4/+; msn<sup>66946</sup>/+* (b), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn<sup>66946</sup>/+* (b'), *vg-GAL4/+; puc<sup>E69</sup>/+* (c) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc<sup>E69</sup>/+* (c') third-instar wing imaginal discs. Note MMP1 staining (a) and *msn-lacZ* expression (b) in the notum (white arrowheads) are constitutive and independent from *Psn* overexpression. Note that *puc-lacZ* expression at the tip of the notum reflects the JNK pathway activation required for thorax closure (c, white arrow). (d, d') Colocalization (white) between anti- $\beta$ -Galactosidase staining (green) to detect *puc* expression and either TUNEL labeling (d, red) to detect apoptosis or anti-PH3 (d', red) to detect mitotic cells in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc<sup>E69</sup>/+* third-instar larvae wing imaginal discs. (e–e'') TUNEL staining in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (e), *UAS-bsk<sup>DN</sup>/+* *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (e'), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hep-RNAi/+* (e'') and in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-cdk5-RNAi* (e''') third-instar wing imaginal discs.

Next, we tested whether the JNK pathway could modulate ER stress-induced *dilp8* expression and therefore developmental timing. Reducing the JNK activity by overexpressing *puc*, which encodes a phosphatase negatively regulating JNK signaling,<sup>43,44</sup> significantly rescued the developmental delay (Figure 4a), led to an aggravation of the wing phenotype (Figure 4b) and suppressed *dilp8* expression (Figures 4c and d). Opposite effects on developmental delay, wing phenotype and *dilp8* expression were observed in flies heterozygous for the *puc*<sup>E69</sup> loss-of-function mutant allele (Figures 4a–d). Altogether, these results show that JNK signaling is involved in maintaining tissue homeostasis after ER-stress, by stimulating *dilp8* expression.

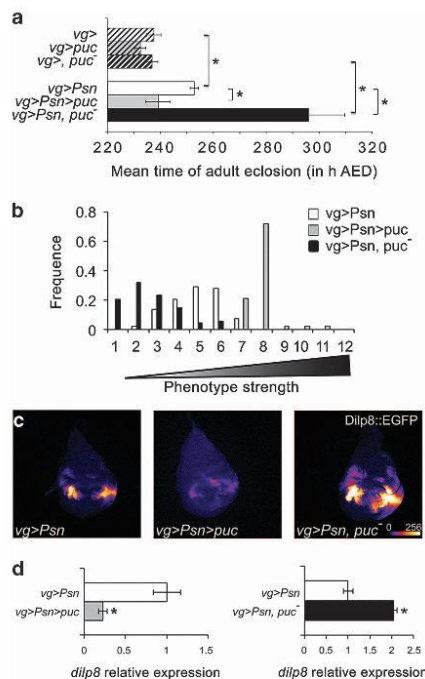
To address the question of the mechanism of activation of the JNK pathway, we tested whether the JNK signaling depends on DIAP1/Dronc. Given that the ER stress involved

Dronc activation (Figures 1a and c) and DIAP1 downregulation (Figures 1d and f), we overexpressed both *Psn* and *diap1* to counteract DIAP1 decrease and block Dronc activation. Under these conditions, caspase activation was strongly suppressed but no significant modification of the JNK activation was revealed by anti-MMP1 staining or by detecting *dilp8* expression (Figures 5a and b). Altogether, these results suggest that JNK signaling is not mainly controlled by DIAP1/Dronc.

We next checked whether the components of the PERK branch of the UPR could modulate the JNK pathway activation. Depletion of ATF4 strongly reduced the JNK activation that was directly assayed by an anti-MMP1 staining or indirectly by detecting *dilp8* expression (Figures 5c and d). Similar results were observed by reducing the dosage of the ATF4-encoding gene, *crc*, thanks to *crc*<sup>1</sup> and *crc*<sup>EG00047</sup> hypomorphic mutant alleles (data not shown). In agreement with *dilp8* expression reduction, ATF4 depletion also suppressed the ER stress-induced developmental delay (Figure 5e). Similar results were found by depleting PERK and converse effects were observed when GADD34 was depleted (Supplementary Figure S5), confirming that the PERK/ATF4 branch of the UPR activates JNK signaling. Therefore, tissue homeostasis is maintained when ER stress induces cell death thanks to a developmental delay controlled by the JNK pathway in an ATF4-dependent manner.

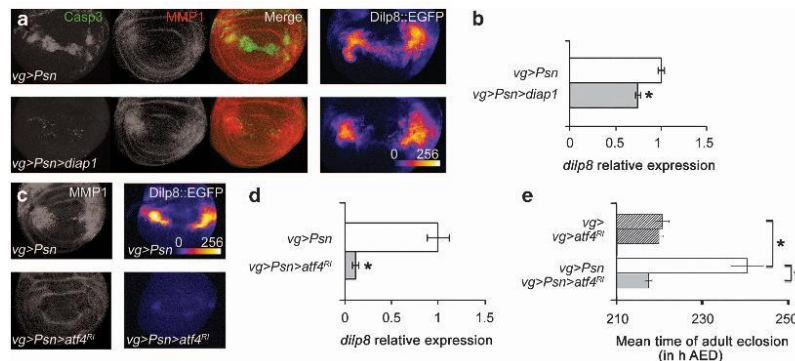
**A Rac1/Slpr-dependent JNK pathway regulates developmental delay after ER-stress.** The core of the JNK pathway is composed by Jra and Kay, which dimerize to form the DAP-1 transcription factor, and the unique JNK, Bsk. We observed that *Jra* or *kay* depletion, which had no effect in the absence of ER stress, aggravated the wing phenotype (Supplementary Table S1), showing that the JNK pathway core is involved in tissue homeostasis after an ER stress.

We decided to identify the upstream JNK pathway components that promote ER stress-induced developmental delay. A shift toward stronger wing phenotypes was observed when the JNKs dMKK4 and Hep (Supplementary Table S1) or the JNKKK Slpr were depleted by RNAi in the presence of ER stress-induced cell death (Figure 6a, Supplementary Table S1). These depletions did not have any detectable effect by themselves (data not shown). Slpr depletion also decreased *dilp8* expression and the ER stress-induced developmental delay (Figures 6d, g and j). Slpr can be activated by direct interaction with either Msn or the Rac1 GTPase.<sup>45</sup> We thus examined if these interactors participate to ER stress-associated JNK signaling. Surprisingly, *msn* depletion induced a distribution shift toward weaker phenotypes (Figure 6b). It also increased both *dilp8* expression (Figures 6e and h) and developmental delay (Figure 6k) in response to ER stress. These results suggest that Msn may antagonize JNK signaling, which, to our knowledge, has only been observed once.<sup>46</sup> As ER stress induces *msn* expression (Figure 3b), we thus asked whether this was in a JNK-dependent manner. Indeed, the expression of a Bsk dominant negative form strongly reduced *msn* expression (data not shown), suggesting that Msn could belong to a JNK pathway negative feedback induced after ER stress.



**Figure 4** The JNK pathway regulates a Dilp8-dependent developmental delay. (a) Effects of *puc* overexpression (*UAS-puc*) (gray) and *puc* mutant heterozygosity (*puc*<sup>E69</sup>/+) (black) compared with control (white) in a *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) or *vg-GAL4/+* (hatched bars) background on the mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. ( $n=4$ ). Asterisks indicate significant difference ( $P<10^{-4}$ , ANOVA). (b) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*; *UAS-puc/+* (gray bars) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc*<sup>E69</sup>/+ (black bars) flies compared with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* flies (open bars). (c, d) Intensity of GFP reflecting *dilp8* expression in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*; *dilp8*<sup>M00727</sup>/+ (c left, d white bars), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*<sup>M00727</sup>/*UAS-puc* (c center, d gray bar), and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*<sup>M00727</sup>/*puc*<sup>E69</sup> (c right, d black bar) third-instar wing imaginal discs. Error bars represent the S.E.M. of at least eight independent experiments. Asterisks indicate significant difference ( $P<10^{-3}$ , ANOVA).





**Figure 5** ATF4 activates the JNK pathway. (a, left) Anti-activated caspase 3 (green) and anti-MMP1 (red) staining in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-diap1/+* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (a, right) Intensity of GFP in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727/+</sup>* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727/+</sup>; UAS-diap1* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (b) Quantification of relative *dilp8::EGFP* expression. Error bars represent the S.E.M. of at least nine independent experiments. The asterisk indicates significant difference between the indicated genotype and the control ( $P < 10^{-5}$ , ANOVA). (c) Anti-MMP1 staining (left) and intensity of Dilp8::EGFP detection (right) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (top) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-atf4-RNAi* (bottom) third-instar wing imaginal discs. (d) Quantification of relative *dilp8* expression. Error bars represent the S.E.M. of at least four independent experiments. The asterisk indicates significant difference between the indicated genotype and the control ( $P < 10^{-4}$ , ANOVA). (e) Effects of ATF4 depletion (gray bars) compared with control (white bars) on *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (solid bars) and *vg-GAL4/+* (streaked bars) on the mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. ( $n = 3$ ). The asterisk corresponds to a statistical difference ( $P < 10^{-3}$ , ANOVA).

Finally, depletion of *rac1* induced a shift toward stronger wing phenotypes (Figure 6c) and a decrease of *dilp8* expression (Figures 6f and i) resulting in a developmental delay suppression (Figure 6l). Therefore, Rac1 seems to be the JNK pathway activator that triggers ER stress-induced developmental delay. In conclusion, the developmental delay seems to be dependent of a Rac1/SIpr/JNK pathway.

## Discussion

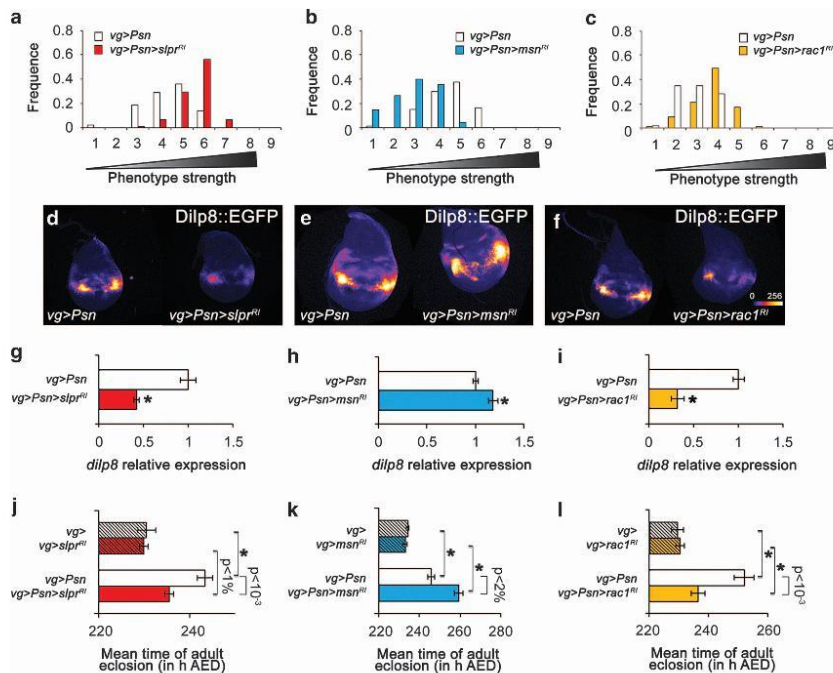
As previously reported in mammalian cells, we have validated that *Psn* overexpression can provoke chronic ER stress in *Drosophila*.<sup>26</sup> In mammalian models, the UPR branches can display opposite roles depending on the model. For example, Perk can be either anti or proapoptotic.<sup>47–49</sup> Thanks to a new model of chronic ER stress, we have demonstrated in this study that the PERK/ATF4 pathway has a fundamental role in *Drosophila* tissue homeostasis (Figure 7). So far, the ADRP model was the only model of strong chronic ER stress reported in *Drosophila*.<sup>5,24</sup> We have validated that *Psn* overexpression can also provoke a chronic ER stress in *Drosophila*, as previously reported in mammalian cells.<sup>26</sup> In both *Drosophila* models, apoptosis is induced by UPR in response to ER stress. Nevertheless, this induction involves totally different pathways. In our chronic ER stress model, cell death induction is PERK/ATF4 dependent and JNK independent, contrarily to the ADRP model in which CDK5 activates JNK signaling that triggers apoptosis.<sup>5</sup> These differences show that the complexity of ER stress-induced signaling found in mammals is conserved in *Drosophila*, thus highlighting the usefulness of ER stress models plurality.

We have shown that the PERK/ATF4 pathway induces a caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* transcription. However, PERK has been described to exert some

antiapoptotic activity by inducing *IAP* gene expression in mammals.<sup>47</sup> This effect does not seem to rely on direct targets of PERK, ATF4 and CHOP.<sup>50</sup> Similarly, we did not find any ATF4 consensus binding sequence (5'-RTRTCRTCA-3') in the *diap1* promoter region and no CHOP homolog has been found in *Drosophila*. Therefore, the mechanisms involved in PERK regulation of IAPs remain to be clarified.

In our chronic ER stress model, the JNK pathway is activated in apoptotic cells to favor tissue homeostasis without stimulating cell proliferation. This is in contrast to a JNK activation in cells neighboring apoptotic cells, which results in an increase of the proliferation rate.<sup>11</sup> Similar to our observation, JNK activation in apoptotic cells has been observed in 'undead cell' models.<sup>9,12–14</sup> In these models, the JNK pathway could be activated by DIAP1 or DRONC, whereas JNK signaling seems to be primarily independent from DIAP1/DRONC in our model. In a mammalian model of chronic ER stress, the IRE1 branch of the UPR activated the JNK pathway to trigger apoptosis thanks to TRAF2/ASK1.<sup>51</sup> In our ER stress model, depletion of *traf2* or *ask1* had no effect (Supplementary Table S1 and data not shown). Instead, we have shown for the first time that JNK pathway activation mainly depends on the PERK/ATF4 pathway. Interestingly, this particular JNK pathway is not mainly activated by apoptosis and does not modulate cell death or proliferation.

We have also shown that PERK/ATF4 regulates an ER stress-induced developmental delay. As previously reported, we observed that Dilp8 is a major contributor to developmental delay.<sup>19,23</sup> An obvious candidate for a Dilp8-independent developmental delay regulation was the retinoic acid signaling that has been reported to modulate an irradiation-induced developmental delay.<sup>22</sup> We have tested if this pathway could also regulate the developmental delay caused by *Psn*



**Figure 6** The Rac1/Sipr JNK pathway triggers an ER stress-induced developmental delay negatively controlled by Msn. (a–c) Distribution of notched-wing phenotypes of *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-slpr-RNAi/+* (a, red), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-msn-RNAi/+* (b, blue) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Rac1-RNAi/+* (c, yellow) flies compared with *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* flies (a–c, white). (d–f) Intensity of GFP emitted by the *dilp8::EGFP* reporter in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (d–f), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-slpr-RNAi/+* (d, g), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-msn-RNAi/+* (e, h) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Rac1-RNAi/+* (f, i) third-instar wing imaginal discs. Error bars represent the S.E.M. of at least six independent experiments. Asterisks indicate significant difference between the indicated genotype and its control ( $P < 10^{-4}$ ). (j–l) Effects of Sipr (j, red), Msn (k, blue) and Rac1 (l, yellow) depletion compared with the control (white) in a *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (plain bars) or *vg-GAL4/+* (hatched bars) background on mean time of adult eclosion. Error bars represent the S.E.M. of seven independent experiments. Asterisks correspond to significant difference between controls without *Psn* (hatched bars) and the indicated genotype ( $P < 10^{-4}$ , ANOVA).

overexpression. No wing phenotype modification was detected upon the downregulation of this pathway (data not shown).

We have characterized the components of the JNK signaling that is activated in response to chronic ER stress in *Drosophila* wing imaginal discs (Figure 7). The small GTPase Rac1 would activate the JNKKKK Sipr, which in turn would activate JNK signaling core to regulate *dilp8* expression and ultimately favor development delay and tissue homeostasis maintenance. How the ATF4/PERK branch activates Rac1 remains to be elucidated. Our results also suggest the existence of a negative feedback loop regulating the JNK pathway, which would involve the JNKKKK, Msn. This is in agreement with a genetic and phosphoproteomic study showing that Msn is able to inhibit the phosphorylation of Jun.<sup>46</sup> Considering that the JNK pathway induces *dilp8* expression in abnormally growing imaginal discs in other stress models,<sup>19</sup> one may wonder whether the same JNK pathway is implicated in these models. Moreover, one may wonder whether *dilp8* control during tissue homeostasis-associated developmental delay

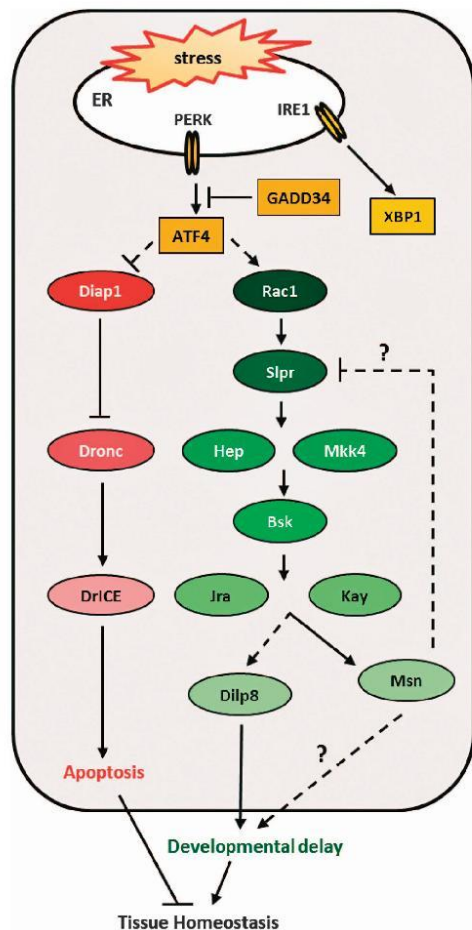
is always JNK-dependent and relies on a Rac1/Sipr pathway.

To summarize, we have shown in this study that in response to an ER stress induced by *Psn* overexpression, the PERK pathway is activated resulting in a Janus-faced ATF4 role. On one hand, ATF4 induces caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* expression and on the other hand, it favors tissue homeostasis maintenance through the induction of a Rac1/Sipr/JNK pathway and the resulting *dilp8* expression. More investigations on this new *Drosophila* chronic ER-stress model should allow the identification of novel regulators of UPR-dependent tissue and organism homeostasis that may be conserved in mammals.

#### Materials and Methods

**Drosophila crosses and strains.** Flies were raised on standard corn-agar medium. All crosses were performed at 25 °C. The *Drosophila* strains used carried *vg-GAL4*,<sup>32</sup> *puc<sup>EG9</sup>*,<sup>41</sup> *UAS-puc*,<sup>43</sup> *UAS-Psn* (*Psn*+14),<sup>53</sup> *UAS-xbp1::EGFP* reporter,<sup>32</sup> *UAS-diap1*,<sup>54</sup> *UAS-EGFP9.2*,<sup>55</sup> *UAS-p35* (Bl#6298), *msn*<sup>6646</sup> (Bl#11707), *th<sup>508</sup>* (Bl#12093),<sup>35</sup> *UAS-bsk<sup>DN</sup>* (Bl#108773),<sup>56</sup> *dilp8<sup>M00727</sup>* (Bl#33079). The *UAS-cdk5-RNAi* (Bl#35287), *UAS-atf4-RNAi* (Bl#25985), *UAS-Rac1-RNAi* (Bl#28985) strains from the Transgenic RNAi Project (TRIP) were provided by the Bloomington





**Figure 7** Model of tissue homeostasis maintenance after an ER stress. Chronic ER stress activates the PERK pathway, which results in ATF4 expression. ATF4 has two antagonistic functions. On one hand, ATF4 induces a caspase-dependent apoptosis by repressing *diap1* expression. On the other hand, it favors tissue homeostasis through the induction of *dilp8* expression by Rac1/Slpr/JNK pathway activation. The role of *Msn* in the control of the observed developmental delay remains to be elucidated. It could either negatively regulate the JNK pathway or have a JNK pathway-independent mechanism of action

Drosophila Stock Center (BDRC, Bloomington, IN, USA). The *UAS-slpr-RNAi* (ID 106449) and *UAS-msn-RNAi* (ID 101517) strains were obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria), while the *UAS-hep-RNAi* (4353R2) strain was provided by the National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Kyoto, Japan). Genetic background control strains were adapted to the different transgenic lines we used. The *thead<sup>M00296</sup>* (B1#30955) strain was used as the control for *dilp8<sup>M00727</sup>* (B1#33079) genetic background, the *y.w[1118]:P[attP]y[+], w[3]* (ID 60100) line was the control of the KK library hosted by the VDRC, the *y<sup>1</sup> v<sup>1</sup>; P[UAS-GFP:VALIUM10]attP2* (B1#35786) was used as a control for the TRIP V10 library and *y<sup>1</sup> sc<sup>1</sup> v<sup>1</sup> P[nos-phiC31int.NLS]X; P[CaryP]attP2* (B1#25710) for the TRIP V20 library. Canton S flies were used as reference for all the other strains.

**Immunostaining, TUNEL assay and microscopy.** Wing discs of third-instar male larvae were dissected in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde for 20 min at room temperature. Samples were then washed thrice in PBT 0.3%. TUNEL staining was performed following manufacturer's instructions (ApoTag Red *in situ* apoptosis detection kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Immunostaining was always performed, according to standard protocols, before the TUNEL assay. The following primary antibodies were used: rabbit anti-Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1:20), mouse anti- $\beta$ -galactosidase (40-1a, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1:200), mouse anti-MMP1 (5H7B11, DSHB, University of Iowa, IA, USA, 1:30), mouse anti-DIAP1 (kind gift from B Hay, 1:200). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 568 or 647 were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA 1:400). Discs were mounted in Citifluor (Biovalley, Marne-La-Vallée, France). Images were captured using a Leica SPE confocal laser-scanning microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Images were processed and treated with ImageJ and Adobe Photoshop 8.0. We used the Colocalization plugin (Pierre Bourdoncle, 2003), which considers that two signals colocalize if their respective intensities are strictly higher than the threshold of their channels and if their ratio of intensity is strictly higher than the ratio setting value (here, 75%). Transverse sections were computationally generated after reslicing confocal stacks using ImageJ. GFP mean intensity of the *Dilp8<sup>M00727</sup>*-encoded protein trap was evaluated using the 'measure' function of ImageJ.

**Developmental timing and 20E treatment.** Eighty females were crossed to 40 males and transferred to fresh food after 2 days for 1 h to deposit eggs on culture medium. Flies reaching adulthood or pupariating were then counted every 3 h. Addition of ecdysteroid (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was performed accordingly to standard protocols.<sup>22</sup> Each experiment was realized at least thrice independently and data were statistically analyzed by ANOVA.

**Genetic interaction test.** Genetic interactions were tested based on the modulation of the severity of *Psn* overexpression-dependent notched-wing phenotype. Wings were categorized according to the number and size of notches observed in their margin (Supplementary Figure S1A). To control the genetic background, mutant strains and control strains were first crossed with males containing reference chromosomes carrying markers, that is, *B* for chromosome II and *Dr* for chromosome III. Male progeny carrying *B*, *Dr* and the mutation to be tested were crossed with *vg-GAL4*, *UAS-Psn*, *UAS-Psn* flies. To rule out any effect by itself of the tested strains, control crosses with *vg-GAL4* females were performed for each strain. Only the results obtained with males are depicted in figures although all data were statistically analyzed by ANOVA, which allows to determine the effect of the chromosome of interest compared with the same chromosome in the control genetic background.

**RNA extraction and RT-qPCR.** Fifty wing imaginal discs were dissected in the RNA XS NucleoSpin kit's lysis buffer on ice for each genotype. Total RNAs were extracted using this kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RT was performed using 4.8  $\mu$ g of RNA incubated with random primer oligonucleotides and Recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA). Real-time PCR was performed using the ABI Prism 7700 HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) with SYBRGreen mastermix (Abgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 11 ng of cDNA. The real-time PCR primers (Invitrogen, Life Technologies) were designed as in Garelli *et al.*<sup>23</sup> Three independent RT experiments were performed and data were normalized against *rpl49* mRNA levels.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** Confocal image acquisition and analysis were performed on CYMAGES imaging facility. We thank S Netter, B Limbourg-Bouchon, B Hay, J-A Lepesant and ME Fortini for providing fly stocks and antibodies. We are very grateful to S Netter and I Guenal for suggestions on the manuscript and helpful discussions throughout this work. We thank C Pirou, P Gandille, C Wintz and our team for their contribution to this project. This article is dedicated to the memory of Didier Contamine who succumbed to a long illness after initiating this project. We acknowledge the NIG (National Institute of Genetics, Kyoto, Japan), Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria) and Bloomington Stock center (Bloomington, IN, USA) for providing fly stocks.

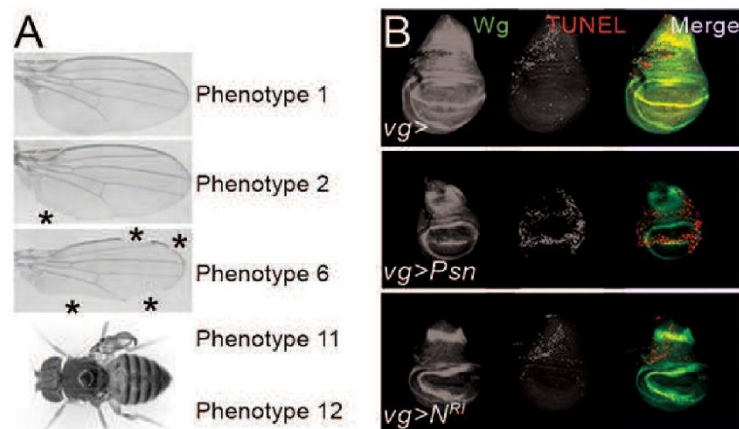
1. Pali C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 349–355.
2. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; **18**: 575–599.
3. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; **110**: 1389–1398.
4. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; **334**: 1081–1086.
5. Kang MJ, Chung J, Ryoo HD. CDK5 and MEK1 mediate pro-apoptotic signaling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 409–415.
6. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; **14**: 996–1007.
7. Ryoo HD, Steller H. Unfolded protein response in *Drosophila*: why another model can make it fly. *Cell Cycle* 2007; **6**: 830–835.
8. Mollereau B, Perez-Garjao A, Bergmann A, Miura M, Gerlitz O et al. Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 181.
9. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* 2004; **7**: 491–501.
10. Perez-Garjao A, Shlevkov E, Morata G. The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* 2009; **136**: 1169–1177.
11. Bergantinos C, Corominas M, Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signaling. *Development* 2010; **137**: 1169–1179.
12. Huh JR, Guo M, Hay BA. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* 2004; **14**: 1262–1266.
13. Wells BS, Yoshida E, Johnston A. Compensatory proliferation in *Drosophila* imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity. *Curr Biol* 2006; **16**: 1606–1615.
14. Kondo S, Senoo-Matsuda N, Hiroi Y, Miura M. DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7258–7268.
15. Perkins KK, Dailey GM, Tjian R. Novel Jun- and Fos-related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *EMBO J* 1988; **7**: 4265–4273.
16. Chen W, White MA, Cobb MH. Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49105–49110.
17. Stronach B, Perrimon N. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* 2002; **16**: 377–387.
18. Stronach B. Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. *Dev Dyn* 2005; **232**: 575–584.
19. Colombani J, Andersen DS, Leopold P. Secreted peptide Dllp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 2012; **336**: 582–585.
20. Hussey RG, Thompson WR, Calhoun ET. The Influence of X-Rays on the Development of *Drosophila* Larvae. *Science* 1927; **66**: 65–66.
21. Simpson P, Berreux P, Berreux-Bonnerfant J. The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J Embryol Exp Morphol* 1980; **57**: 155–165.
22. Halme A, Cheng M, Hariharan IK. Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol* 2010; **20**: 458–463.
23. Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science* 2012; **336**: 579–582.
24. Ryoo HD, Domingos PM, Kang MJ, Steller H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J* 2007; **26**: 242–252.
25. Michno K, Knight D, Campusano JM, van de Hoef D, Boulianne GL. Intracellular calcium deficits in *Drosophila* cholinergic neurons expressing wild type or FAD-mutant presenilin. *PLoS One* 2009; **4**: e6904.
26. Honarnejad K, Jung CK, Lammich S, Arzberger T, Kretschmar H, Herms J. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2013; **17**: 293–302.
27. Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM, Wojczyk BS, Tanzi RE et al. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9223–9228.
28. Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D et al. Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; **147**: 277–294.
29. Levitan D, Lee J, Song L, Manning R, Wong G, Parker E et al. PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 12186–12190.
30. Kim J, Kleizen B, Choy R, Thinakaran G, Sisodia SS, Schekman RW. Biogenesis of gamma-secretase early in the secretory pathway. *J Cell Biol* 2007; **179**: 951–963.
31. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993; **118**: 401–415.
32. Souid S, Lepesant JA, Yancostas C. The xbp-1 gene is essential for development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 2007; **217**: 159–167.
33. Fan Y, Bergmann A. The cleaved-caspase-3 antibody is a marker of caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 534–539.
34. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1011–1022.
35. Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and uboD1. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 432–438.
36. Smith-Bolton RK, Worley MJ, Kanda H, Hariharan IK. Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by wingless and Myc. *Dev Cell* 2009; **16**: 797–809.
37. Herrera SC, Martin R, Morata G. Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development. *PLoS Genet* 2013; **9**: e1003446.
38. Bryant PJ, Simpson P. Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol* 1984; **59**: 387–415.
39. Haynie JL, Bryant PJ. Intercalary regeneration in imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1976; **259**: 659–662.
40. Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Ponderville E, Dauphin-Villemand C, Antoniewski C et al. Antagonistic actions of ecdysone and insulin determine final size in *Drosophila*. *Science* 2005; **310**: 667–670.
41. Ring JM, Martinez Arias A. Puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl* 1993; **121**: 251–259.
42. Marchal C, Vinalier G, Sanial M, Plessis A, Pret AM, Limbourg-Bouchon B et al. The HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in *Drosophila* via activation of JNK signaling. *PLoS One* 2012; **7**: e34310.
43. Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM et al. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 1998; **12**: 557–570.
44. McEwen DG, Peller M. Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* 2005; **132**: 3935–3946.
45. Garlena RA, Gonda RL, Green AB, Pileggi RM, Stronach B. Regulation of mixed-lineage kinase activation in JNK-dependent morphogenesis. *J Cell Sci* 2010; **123**: 3177–3188.
46. Bakal C, Lindig R, Lense F, Heffern E, Martin-Blanco E, Pawson T et al. Phosphorylation networks regulating JNK activity in diverse genetic backgrounds. *Science* 2008; **322**: 453–456.
47. Hamanaka RB, Bobrovnikova-Marjon E, Ji X, Liebhaber SA, Diehl JA. PERK-dependent regulation of IAP translation during ER stress. *Oncogene* 2009; **28**: 910–920.
48. Verfaillie T, van Vliet A, Garg AD, Dewaele M, Rubio N, Gupta S et al. Pro-apoptotic signaling induced by photo-oxidative ER stress is amplified by Noxa, not Bim. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **438**: 500–506.
49. Commen D, Prise KM. Down-regulation of PERK enhances resistance to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **441**: 31–35.
50. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 481–490.
51. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002; **16**: 1345–1355.
52. Simmonds AJ, Brook WJ, Cohen SM, Bell JB. Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* 1995; **376**: 424–427.
53. Ye Y, Fortini ME. Characterization of *Drosophila* Presenilin and its colocalization with Notch during development. *Mech Dev* 1998; **79**: 199–211.
54. Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995; **83**: 1253–1262.
55. Netter S, Fauchaux M, Theodore L. Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo. *DNA Cell Biol* 2001; **20**: 483–492.
56. Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E et al. p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2322–2329.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

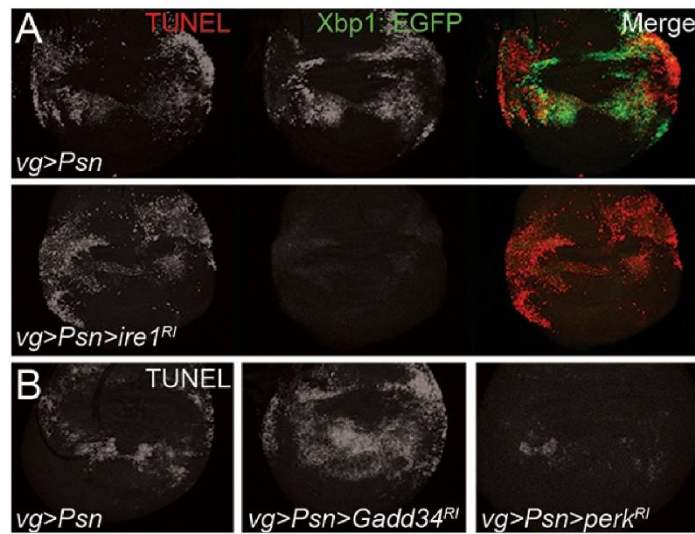
Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)





**Supplementary Figure S1** *Psn* overexpression-induced phenotypes differ from Notch loss-of-function phenotypes.

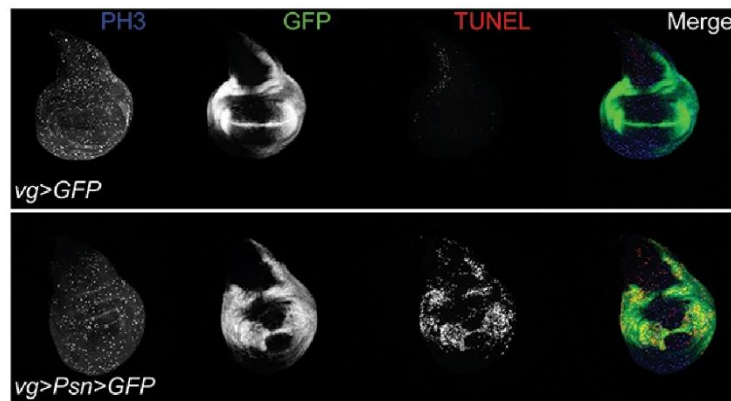
(A) *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* notched wing phenotypes can be categorized according to the number and size of the wing margin notches (asterisks). They range from a wild-type phenotype (phenotype 1) to the complete absence of a wing (phenotype 12). (B) Anti-Wingless (mouse anti-Wingless, 4D4, DSHB, 1:200, green) and TUNEL (red) stainings in *vg-GAL4/+* (top), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (middle) and *vg-GAL4, UAS-Notch-RNAi/+* (bottom) third instar wing imaginal discs show that *Psn* overexpression does not turn off *wg* expression but induces apoptosis in the *vg* domain while *Notch* down-regulation has an opposite effect on both stainings. Notch depletion does not recapitulate the effects of an overexpression of *Psn*, thus indicating that *Psn* overexpression-dependent phenotypes are independent from *Psn*  $\gamma$ -secretase activity.



**Supplementary Figure S2** The PERK pathway is responsible for *Psn* overexpression-induced apoptosis.

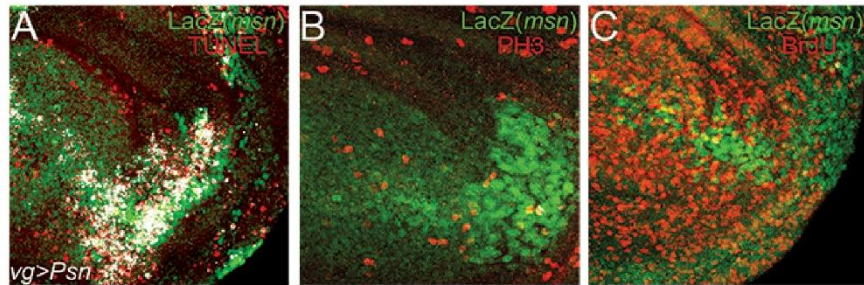
(A) TUNEL staining (red) and detection of Xbp1::EGFP reporter fluorescence (green) in *vg*-GAL4, *UAS-Psn*, *UAS-Psn/+*; *UAS-xbp1::EGFP/+* (top) and *vg*-GAL4, *UAS-Psn*, *UAS-Psn/UAS-ire1*; *UAS-xbp1::EGFP/+* (bottom). (B) TUNEL staining in *vg*-GAL4, *UAS-Psn*, *UAS-Psn/+* (left), *vg*-GAL4, *UAS-Psn*, *UAS-Psn/+*; *UAS-Gadd34-RNAi/+* (center) and *vg*-GAL4, *UAS-Psn*, *UAS-Psn/UAS-perk-RNAi* (right) third instar wing imaginal discs.





**Supplementary Figure S3:** ER stress-dependent apoptosis does not induce compensatory proliferation.

Anti-Phospho-Histone 3 (PH3) (rabbit anti-phospho-Histone H3 Ser10, Millipore, 1:1000) staining (blue) to detect mitotic cells, GFP detection (green) to visualize the *vg* expression domain, and TUNEL staining (red) to detect apoptosis in *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (top row) and *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (bottom row) third instar wing imaginal discs.



**Supplementary Figure S4** The JNK pathway is activated in apoptotic cells but not in proliferating cells.

Colocalization (white) between anti- $\beta$ -Galactosidase staining (green) to detect *msn* expression and either TUNEL labeling to detect apoptosis (A, red), anti-PH3 to detect mitotic cells (B, red) or anti-BrdU to detect cells in S-phase (C, red) in *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn<sup>06946</sup>/+* third instar larva wing imaginal discs.

	Genes	Mutations/RNAis	n	p	Stock-ID
Enhancing	Jra	<i>P{Jbz}1</i>	687	$<10^{-7}$	BL#7217
		<i>P{Jbz}10</i>	746	$<10^{-6}$	BL#7218
		<i>Jra<sup>IA109</sup></i>	306	$<10^{-3}$	BL#3273
	kay	<i>kay<sup>sro-1</sup></i>	603	$<10^{-3}$	BL#3091
		<i>P{UAS-Fra.Fbz}5</i>	502	$<10^{-3}$	BL#7214
		<i>P{UAS-Fra.Fbz}7</i>	621	$<10^{-14}$	BL#7215
	bsk	<i>P{NIG.5680R-2}</i>	544	$<10^{-4}$	5680R-2
		<i>bsk<sup>1</sup></i>	407	$<10^{-7}$	BL#3088
	hep	<i>P{NIG.4353R}</i>	752	$<10^{-3}$	4353R
	Mkk4	<i>Mkk4<sup>e01485</sup></i>	529	$<10^{-5}$	BL#17956
		<i>dMKK4[Dfp25]</i>	467	$<10^{-10}$	BL#1944
	slpr	<i>P{KK100726}</i>	581	$<10^{-6}$	v106449
		<i>P{TRiP.HMS00742}</i>	879	$<10^{-6}$	BL#32948
	Rac1	<i>Rac1<sup>J11</sup></i>	404	$<10^{-8}$	BL#6674
		<i>P{TRiP.JF02813}</i>	667	$<10^{-5}$	BL#28985
Suppressing	puc	<i>P{UAS-puc}</i>	517	$<10^{-14}$	
		<i>puc<sup>E69</sup></i>	476	$<10^{-4}$	BL#6762
	msn	<i>P{TRiP.JF03219}</i>	695	$<4.10^{-2}$	BL#28791
		<i>P{NIG.16973R}</i>	506	$<10^{-3}$	16973R
		<i>P{KK108948}</i>	548	$<10^{-7}$	v101517
Neutral	wnd	<i>P{KK100521}</i>	669	$>5.10^{-2}$	v103410
	TAK1	<i>P{TRiP.JF01384}</i>	667	$>5.10^{-2}$	BL#31394
		<i>P{KK108611}</i>	586	$>5.10^{-2}$	v101357
	dASK1	<i>P{GD11408}</i>	193	$>5.10^{-2}$	v34892
		<i>P{GD11408}</i>	638	$>5.10^{-2}$	v34891
	Tab2	<i>P{KK105926}</i>	598	$>5.10^{-2}$	v100326
		<i>Tab2<sup>EY00380</sup></i>	449	$>5.10^{-2}$	BL#14838
	dTRAF1	<i>P{KK107398}</i>	653	$>5.10^{-2}$	v110766
		<i>dTRAF1 GD 21214</i>	354	$>5.10^{-2}$	v21214
	dTRAF2	<i>P{TRiP.HMS00880}</i>	467	$>5.10^{-2}$	BL#33931
		<i>P{KK107947}</i>	600	$>5.10^{-2}$	v110266

**Supplementary Table S1** Status of JNK pathway components toward the adult wing phenotype associated to a chronic ER stress.

n indicates the number of flies counted for the genotype and p indicates the probability found by ANOVA.

## **2. Résultats complémentaires**

### **2.1. Induction de l'apoptose par un stress chronique du RE**

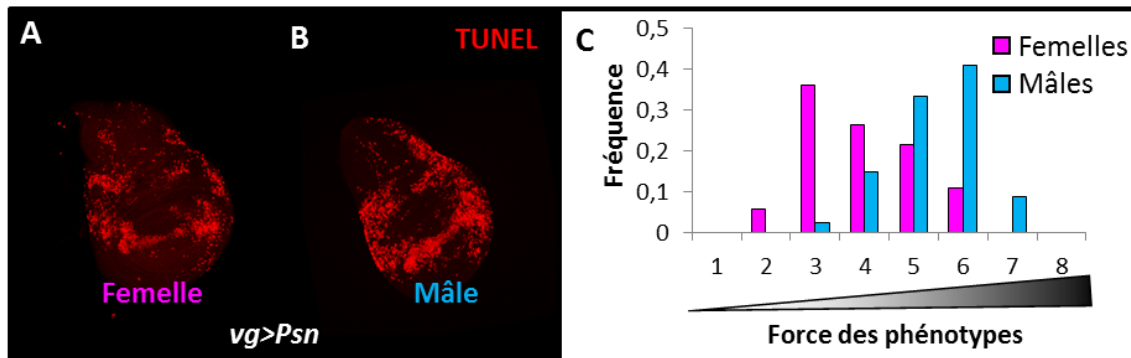
#### **2.1.1. Induction d'un stress chronique du RE par la surexpression de la préséniline**

La forme entière de la préséniline, également appelée forme holoprotéique, est constituée de neuf domaines transmembranaires. Elle est essentiellement présente au niveau de la membrane du RE [108-110], où elle joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie calcique [128, 129, 138-141]. Cette forme entière subit un clivage endoprotéolytique qui aboutit à la formation des fragments N- et C-terminaux (NTF et CTF). Ces fragments restent associés et forment un hétérodimère NTF/CTF qui participe à la formation d'un complexe possédant une activité  $\gamma$ -sécrétase [112]. Une fois activé, ce complexe migre à la membrane plasmique où il joue son rôle de  $\gamma$ -sécrétase qui consiste à cliver des protéines transmembranaires [112], telles que Notch.

Il a été montré, en cellules de mammifère, que la surexpression de la forme entière de la préséniline n'induit pas d'augmentation de l'activité  $\gamma$ -sécrétase [9]. Cette surexpression induirait une accumulation de la forme holoprotéique sans affecter la quantité des fragments NTF et CTF [9, 113]. De plus, en accord avec la fonction de la forme entière, sa surexpression provoque un déséquilibre de l'homéostasie calcique qui peut aboutir à l'induction d'un stress du RE [135].

Comme je l'ai précédemment décrit, nous avons mis en évidence que la surexpression, sous le contrôle du pilote *vg-GAL4*, du gène *Psn*, qui code la forme entière de la préséniline de drosophile, induit également un stress du RE [389]. Ce stress aboutit à l'élimination par apoptose des cellules des disques imaginaux alaires exprimant *Psn*. Cette mort cellulaire se traduit chez les adultes par la présence d'échancrures au niveau de la marge de l'aile dont le nombre est partiellement corrélé à la quantité de cellules apoptotiques au niveau des disques imaginaux d'aile [389]. Ainsi, l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* chez les femelles est plus faible (Figure 33A) que chez les mâles (Figure 33B) et elle est associée à un nombre d'échancrures moins important (Figure 33C).

Ces phénotypes d'échancrures sont similaires aux phénotypes observés lors d'un défaut de la signalisation de la voie Notch [390, 391]. Cependant, leur origine semble différente.



**Figure 33 : La force des phénotypes d'échancrures chez les adultes est corrélée à la quantité d'apoptose présente au niveau des disques imaginaux.**

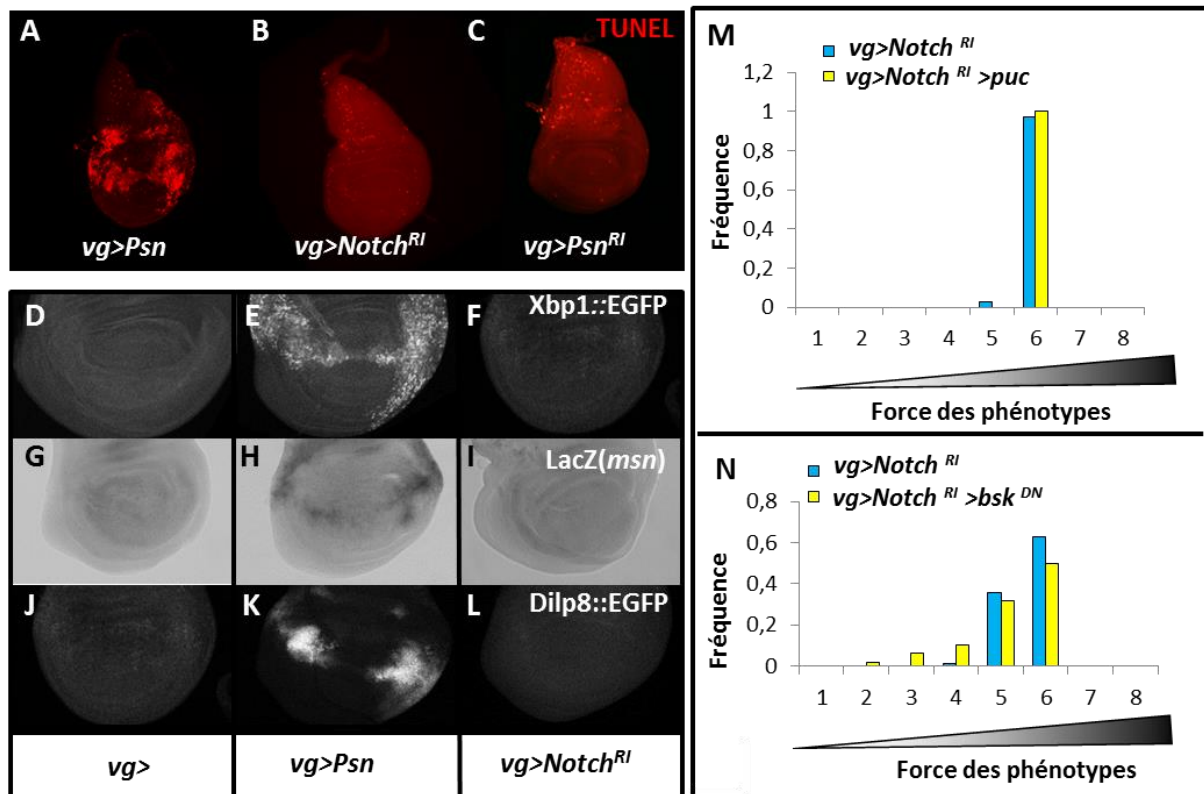
(A,B) Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'ailes de larves femelles (A) et mâles (B) de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*. (C) Répartition des phénotypes d'échancrures des ailes issus de ces larves.

En effet, contrairement à la surexpression de la préséniline (Figure 34A), la déplétion par l'expression d'un ARN interférant (ARNi) spécifique de Notch (Figure 34B), n'induit pas d'apoptose dans des disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire. Un résultat similaire a été observé pour la déplétion de Psn (Figure 34C); ce qui est en accord avec la littérature montrant que les pertes de fonction de Notch et de la préséniline ont des effets équivalents aussi bien chez les mammifères [392] que chez la drosophile [393].

De même, contrairement à la surexpression de la préséniline, nous n'avons observé, suite à la déplétion de Notch dans les cellules apoptotiques, ni activation de la branche IRE1 (Figure 34D-F), détectée par un rapporteur *xbp1::EGFP* qui permet de mettre en évidence l'épissage non-conventionnel de l'ARNm codant XBP1 médié par IRE1 dans le cytoplasme [394], ni activation de la voie JNK détectée par *msn-lacZ* (Figure 34G-I), ni expression de *dilp8*, détectée par *dilp8::GFP* (Figure 34J-L). De plus, la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la déplétion de Notch n'est pas modulée par l'inhibition de la voie JNK (Figure 34M-N). En effet, l'expression de la phosphatase Puc (Figure 34M) et d'un mutant dominant négatif de la JNK Bsk (Figure 34N) ne modulent pas cette répartition, contrairement à celle des phénotypes induits par la surexpression de *Psn* [389]. L'ensemble de ces résultats montre donc que les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline ne sont pas équivalents à ceux induits par la perte de fonction de la voie Notch.

Nous nous sommes ensuite demandé si les phénotypes induits par la surexpression de *Psn* peuvent être une conséquence d'un gain de fonction de l'activité  $\gamma$ -sécrétase. Notch est le substrat du complexe  $\gamma$ -sécrétase le plus étudié. Le produit de son clivage au niveau de la membrane plasmique est Notch<sup>NICD</sup> qui correspond au domaine cytoplasmique de Notch [395]. Si l'hypothèse d'un gain de fonction de l'activité  $\gamma$ -sécrétase est vraie, l'expression de Notch<sup>NICD</sup> pourrait reproduire les effets induits par la surexpression de la préséniline. Nous avons observé que l'expression de Notch<sup>NICD</sup> induit de l'apoptose en faible quantité par rapport à la surexpression de la préséniline, comme le montre les marquages TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) (Figure 35A-C). Par contre, elle induit une forte augmentation du nombre de cellules du domaine d'expression *vg*, mise en évidence par le marquage GFP, qui se traduit par une hypertrophie du disque d'aile comparé au contrôle (Figure 35A'-C').

Il a été montré dans le disque imaginal d'œil de drosophile que l'apoptose induite par la surexpression de la préséniline est inhibée par l'expression de Notch<sup>NICD</sup> [8]. Nous nous sommes donc demandé si cela pouvait également être le cas dans le disque imaginal d'aile.



**Figure 34 : La perte de fonction de la voie Notch ne reproduit pas les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline.**

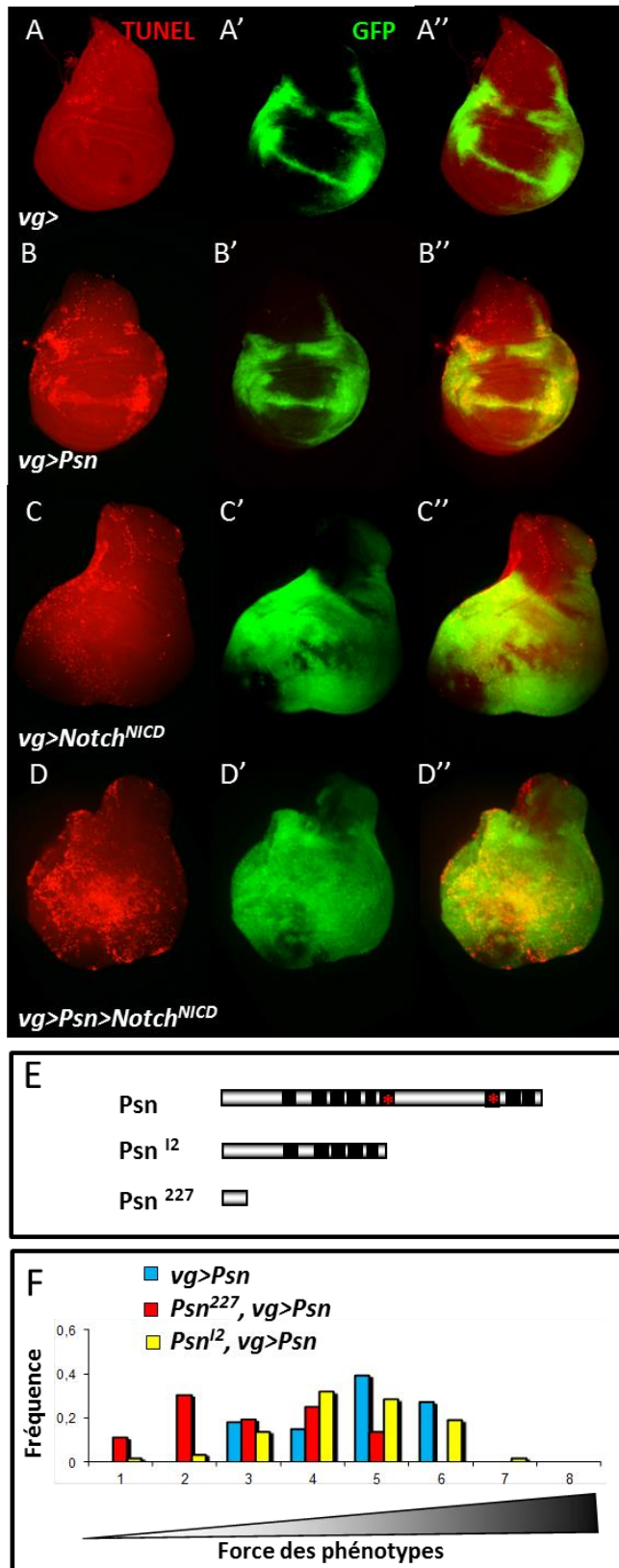
(A-C) Détection des cellules en apoptose par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'ailes de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A), *vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/+* (B) et *vg-GAL4/UAS-Psn-ARNi* (C). (D-F) Détection de la fluorescence associée à l'expression du gène rapporteur *UAS-xbp1::EGFP* dans des disques imaginaux d'ailes de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; UAS-xbp1::EGFP/+* (D); *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-xbp1::EGFP/+* (E), *vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/UAS-xbp1::EGFP* (F). (G-I) Détection de l'expression du gène rapporteur *msn-lacZ* par un immunomarquage anti- $\beta$ -D-Galactosidase dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; msn<sup>lacZ</sup>/+* (G), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn<sup>lacZ</sup>/+* (H), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn<sup>lacZ</sup>/UAS-Notch-ARNi* (I). (J-L) Intensité de l'expression de la GFP reflétant l'expression de *dilp8* dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (J); *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (K); *vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/dilp8<sup>M100727</sup>* (L). (M-N) Distribution des phénotypes d'échancrures d'ailes de mouches de génotype *vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/UAS-puc* (M, barres bleues), *UAS-Bsk<sup>DN</sup>; vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/+* (N, barres bleues) comparée au contrôle de génotype *vg-GAL4/+; UAS-Notch-ARNi/+* (M,N; barres jaunes). Ces phénotypes sont classés en fonction de la taille et du nombre d'échancrures présentes à la marge de l'aile. Les ailes sauvages correspondent à la classe 1. En M et N, les croisements ont été réalisés à 21°C.

Contrairement aux résultats décrits dans le disque imaginal d'œil, l'expression de Notch<sup>NICD</sup> ne diminue pas l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* (Figure 35C-D). A l'inverse, elle semble l'augmenter. Ces résultats suggèrent que la surexpression de *Psn* n'induit pas un gain de fonction de la voie Notch. Ils sont en accord avec l'observation faite chez les mammifères que l'activité  $\gamma$ -sécrétase n'est pas modulée par la surexpression de la préséniline [9, 113].

Outre Notch, le complexe  $\gamma$ -sécrétase possède au moins 60 cibles décrites chez les mammifères. Il serait donc envisageable que l'effet de la surexpression de la préséniline soit dû à la modification de l'activité d'au moins une cible différente de Notch. Afin de déterminer si les phénotypes induits par la surexpression de *Psn* sont dépendants de l'activité  $\gamma$ -sécrétase de *Psn*, *Psn* a été surexprimé dans un fond génétique possédant un allèle nul de *Psn*, *Psn*<sup>12</sup>. Le produit de cet allèle mutant, est une protéine tronquée se terminant au milieu du sixième domaine transmembranaire [396], c'est-à-dire ne présentant pas les sites catalytiques responsables de l'activité  $\gamma$ -sécrétase (Figure 35E). Il s'avère que la répartition des phénotypes d'échancrures induite par la surexpression de la préséniline dans ce fond génétique n'est pas différente de celle induite par la surexpression de *Psn* dans un fond génétique sauvage, dans lequel la préséniline endogène possède ces deux sites catalytiques (Figure 35F). Les sites catalytiques de *Psn* ne semblent donc pas être impliqués dans l'induction des phénotypes induits par la surexpression de *Psn*; à moins que la réduction de l'activité de *Psn* ne soit insuffisante. Afin de tester cette dernière hypothèse, *Psn* a été surexprimé dans un fond génétique présentant un allèle *Psn*<sup>227</sup> qui code une forme tronquée de la préséniline dépourvue des sites catalytiques et des domaines transmembranaires (Figure 35E). Contrairement à l'observation précédente, cet allèle de *Psn* induit un décalage de la répartition des phénotypes d'échancrures vers les phénotypes les plus faibles, comparé à la surexpression de la préséniline dans un fond génétique présentant un allèle sauvage de *Psn*. Ces résultats suggèrent que les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline sont indépendants des sites catalytiques mais qu'ils dépendent des domaines transmembranaires. La quantité en protéines mal-conformées présentes dans le RE pourrait donc être responsable de l'induction du stress du RE.

Afin de tester cette hypothèse, deux approches ont été utilisées pour augmenter la quantité de *Psn*. La première utilise la sensibilité du système UAS-GAL4 à la température. En effet, plus la température est élevée, plus ce système est efficace. *Psn* a été ainsi exprimé sous le contrôle du système UAS-GAL4 à différentes températures. Le nombre de cellules exprimant le rapporteur *xbp1::EGFP* et de cellules apoptotiques s'est avéré être corrélé à la température.

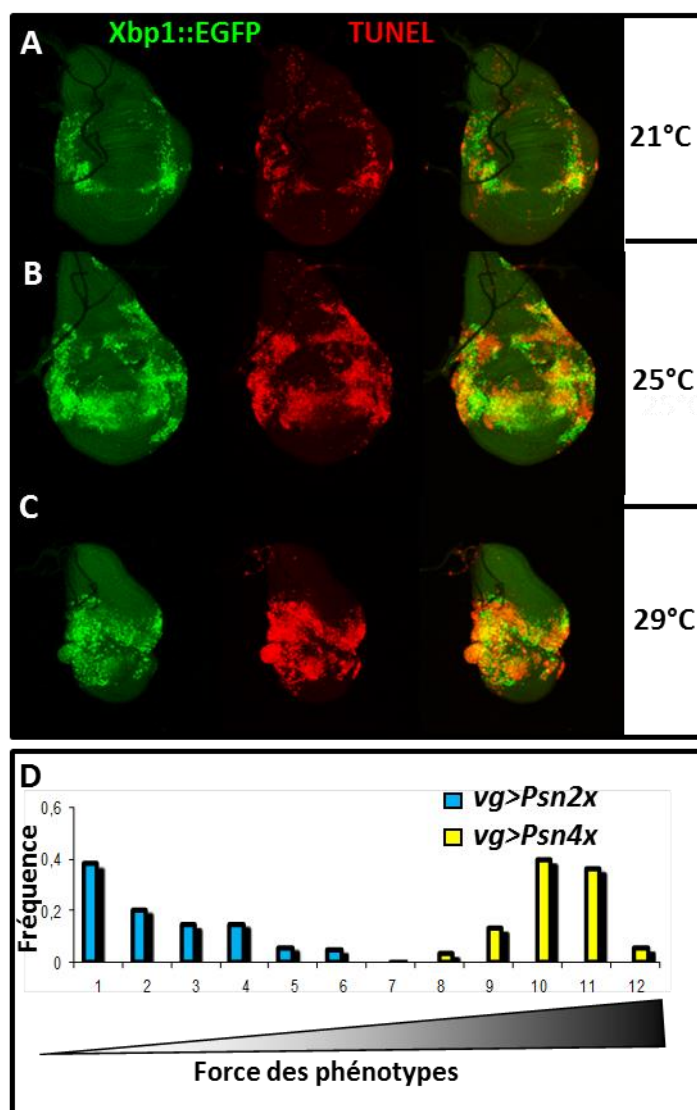




**Figure 35 : Les phénotypes induits par la surexpression de la préséniline ne semblent pas dépendre d'un gain de fonction de la  $\gamma$ -sécrétase.**

(A-D'') Disques imaginaux d'ailes de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (A-A''); *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (B-B''), *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/UAS-Notch<sup>N1CD</sup>* (C-C'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/UAS-Notch<sup>N1CD</sup>* (D-D''). Les cellules apoptotiques sont mises en évidence par un marquage TUNEL (A-D) tandis que la détection de la GFP permet de visualiser le domaine d'expression de *vestigial* (A'-D'). La superposition des deux fluorescences est observée en A''-D''. (E) Représentation schématisée de la forme entière de la Psn et des mutants Psn<sup>12</sup> et Psn<sup>227</sup>. Les étoiles rouges représentent les sites catalytiques. Les barres noires symbolisent les domaines transmembranaires. (F) Distribution des phénotypes d'échancrures d'ailes de mouches de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; Psn<sup>12</sup>/+* (jaune), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; Psn<sup>227</sup>/+* (rouge) comparée au contrôle de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; +/+* (bleu). Ces phénotypes sont classés en fonction de la taille et du nombre d'échancrures présentes à la marge de l'aile. Les ailes sauvages correspondent à la classe 1.

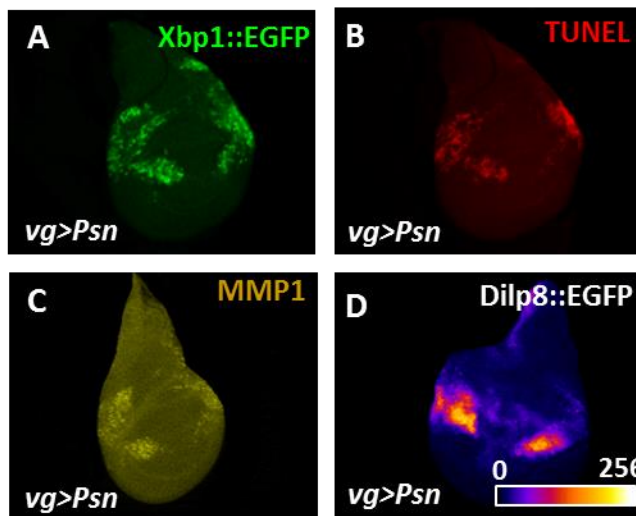
Le stress du RE et l'apoptose sont plus importants à 25°C comparé à 21°C et encore plus à 29°C (Figure 36A-C). La seconde méthode utilisée a consisté à augmenter le nombre de transgènes *UAS-Psn*. La présence de quatre transgènes a induit un décalage important des phénotypes d'échancrures vers les phénotypes les plus forts par rapport au contrôle qui n'en contient que deux (Figure 36D). Ces résultats permettent donc de conclure que le stress du RE est dépendant de la quantité de Psn.



**Figure 36 : Le stress du RE dépend de la quantité de Préséniline.**

(A-C) La détection de la GFP (vert) permet de visualiser l'activation de la branche IRE1 de l'UPR et le marquage TUNEL permet de détecter les cellules apoptotiques dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-xbp1::EGFP/+* issus de croisements réalisés à 21°C (A), à 25°C (B) et à 29 °C (C). (D) Distribution des phénotypes d'échancrures d'ailes de mouches de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (bleu) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/ UAS-Psn, UAS-Psn* (jaune). Ces phénotypes sont classés en fonction de la taille et du nombre d'échancrures présentes à la marge de l'aile. Les ailes sauvages correspondent à la classe 1.

En conclusion, la surexpression de *Psn* semble être un modèle adapté pour étudier les conséquences d'un stress du RE indépendamment de l'activité  $\gamma$ -sécrétase de la préséniline. Les mêmes phénotypes sont observés dans le disque de patte, à savoir : un stress du RE (Figure 37A), de l'apoptose (Figure 37B), une activation de la voie JNK (Figure 37C) et une induction de l'expression de *dilp8* (Figure 37D). Ce modèle d'étude du stress du RE semble donc être généralisable aux tissus composés de cellules non différenciées.



**Figure 37 : Le stress du RE induit par la surexpression de la Préséniline n'est pas spécifique du tissu.**

(A-B) La détection de la GFP permet de visualiser l'épissage de *xbp1* par IRE1 (A) et le marquage TUNEL permet de détecter les cellules apoptotiques (B) dans un disque imaginal de patte de larve de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-*xbp1*::EGFP/+*. (C) Le marquage anti-MMP1 permet de détecter l'activation de

la voie JNK dans un disque imaginal de patte de larve de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+*. (D) La détection de la GFP permet de rapporter l'expression de *dilp8* dans un disque imaginal de patte de larve de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+*.

## 2.1.2. Lien entre le stress du RE et la voie de l'apoptose

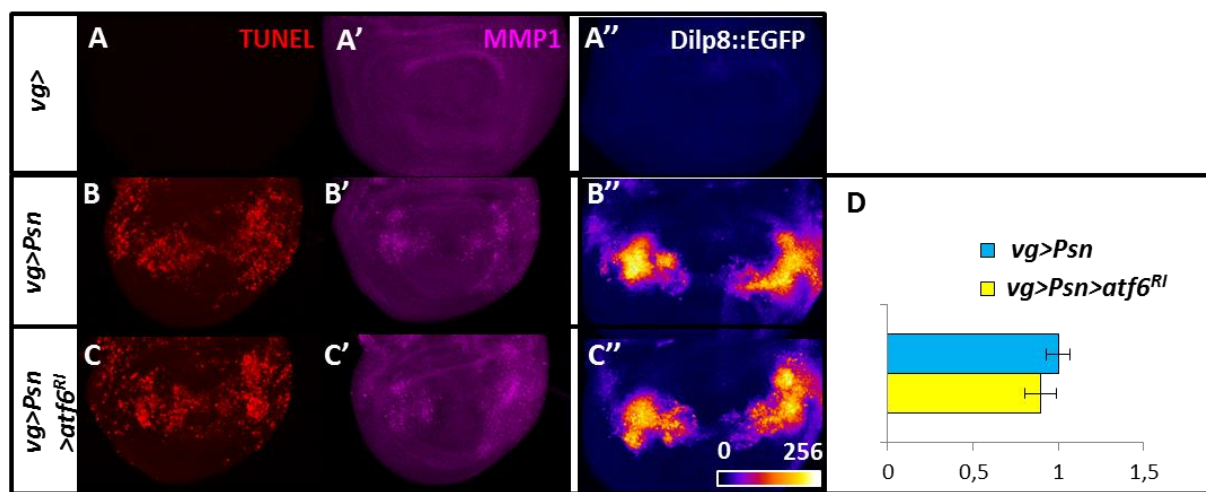
### 2.1.2.1. La branche ATF6 ne semble pas être impliquée dans l'induction de l'apoptose et l'activation de la voie JNK

Nous avons précédemment montré que l'apoptose dépendante d'un stress du RE causé par la surexpression de *Psn* est principalement régulée par la branche PERK/ATF4 de l'UPR. Dans ces conditions, la branche IRE1 est également activée mais elle ne semble pas être responsable des phénotypes décrits [389].

A ce jour, ATF6 ne semble pas faire partie l'UPR chez la drosophile [182, 223, 224]. Nous avons néanmoins testé si cette protéine pouvait être impliquée dans notre système. La déplétion d'ATF6 par l'expression de différents ARNi (P{GD14782} et P{TRiP.JF02109})

n'a pas eu d'effet sur l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* (Figure 38A-C). L'ARNi P{GD14782} semble dépléter efficacement ATF6 puisqu'il a été rapporté qu'il induit une semi-létalité larvaire sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *da-GAL4* [397]. L'efficacité du second ARNi n'a pas été vérifiée. ATF6 ne semble donc pas être impliqué dans notre système. Ce résultat est renforcé par le fait que ces déplétions ne modulent ni l'activation de la voie JNK (Figure 38A'-C'), ni l'expression de *dilp8* (Figure 38A''-C'' et D).

Par conséquent, en supposant que les ARNi utilisés affectent suffisamment leur cible, la branche PERK/ATF4 semble être la seule voie de l'UPR qui jouerait un rôle majeur dans la réponse au stress du RE induit par la surexpression de la préséniline.



**Figure 38 : La voie ATF6 de l'UPR ne serait pas impliquée dans l'induction de l'apoptose et de la voie JNK.**

(A-C') Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL (rouge) et immunomarquage anti-MMP1 (magenta) dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+* (A,A'), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B,B') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-atf6-ARNi/+* (C,C'). (A''-C'') Intensité de détection de la GFP dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; dilp8<sup>MI00727</sup>/+* (A''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>MI00727</sup>/+* (B'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>MI00727</sup>/UAS-atf6-ARNi* (C''). (D) Quantification de l'expression relative de *dilp8::GFP*. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne d'au moins cinq expériences indépendantes (ANOVA ; p=44%).

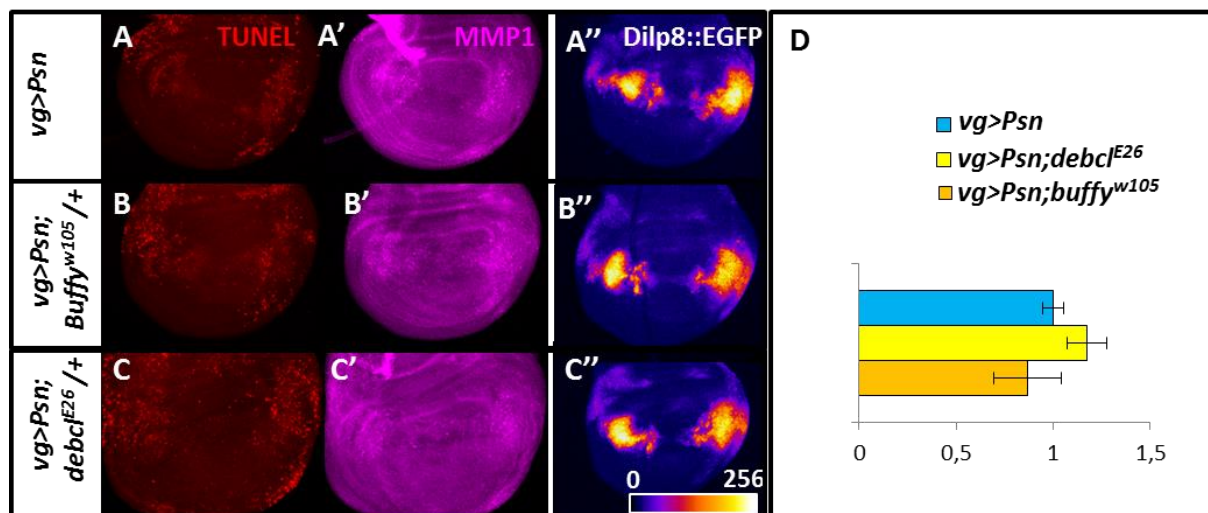
### 2.1.2.2. Activation de l'apoptose par la branche PERK/ATF4

Chez les mammifères, la branche PERK/ATF4 régule l'apoptose en induisant l'expression du gène codant le facteur de transcription CHOP [207, 208, 212]. Ce dernier, en augmentant l'expression des gènes pro-apoptotiques de la famille *bcl-2*, *bim* et *puma*, induit l'apoptose via la voie mitochondriale [214]. En accord avec des études antérieures réalisées chez les mammifères [206, 212], nos résultats montrent que la branche PERK/ATF4 peut également induire l'apoptose en réponse à un stress chronique du RE chez la drosophile [389]. Nous nous sommes donc demandé si les mécanismes impliqués dans l'activation de l'apoptose chez les mammifères sont conservés chez la drosophile.

Les deux seuls membres de la famille Bcl-2 connus chez la drosophile sont *Debcl* et *Buffy* qui peuvent avoir une fonction pro-apoptotique [31, 32, 36], en favorisant l'activation de *Dark* [35]. Nous nous sommes demandé si ces protéines étaient également impliquées dans l'apoptose induite par la branche PERK/ATF4 chez la drosophile. Les réductions du dosage de *Debcl* et de *Buffy* par hétérozygotie pour des mutants perte de fonction de ces deux gènes, ou la déplétion de ces protéines en utilisant des ARNi, dont l'efficacité a été validée (Communication personnelle, Amandine Clavier, LGBC), ne modulent pas l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* (Figure 39A-C). La voie mitochondriale ne semble donc pas impliquée dans l'apoptose induite par ce stress du RE chez la drosophile.

Bien qu'il n'existe aucune description de lien entre les membres de la famille Bcl-2 et la voie JNK chez la drosophile, nous nous sommes demandé si *Debcl* et *Buffy* pouvaient moduler l'activation de cette voie de signalisation. La détection de l'expression de *MMP1* par un immunomarquage montre que les réductions du dosage de *Debcl* et de *Buffy* ne modifient pas l'activation de la voie JNK (Figure 39A'-C'). Ce résultat est confirmé par l'absence de modification de l'expression de *dilp8* comme le montrent les quantifications relatives de l'expression de *dilp8::GFP* (Figure 39A''-C'' et D). La voie mitochondriale de l'apoptose ne semble donc pas être impliquée ni dans l'induction de l'apoptose ni dans l'activation de la voie JNK dans notre système.

Chez les mammifères, CHOP peut également induire l'apoptose en augmentant l'expression d'*ERO1-α* [216, 217] qui code un analogue de PDI et qui favorise l'activation d'IP3R en



**Figure 39 : La voie mitochondriale de l'apoptose ne semble pas être impliquée dans l'apoptose et l'activation de la voie JNK en réponse à un stress du RE.**

(A-C') Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL (rouge) et immunomarquage anti-MMP1 (magenta) dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A,A') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/debcl<sup>E26</sup>* (B,B'); *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/Buffy<sup>w105</sup>* (C,C'). (A''-C'') Intensité de détection de la GFP dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (A''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/debcl<sup>E26</sup>; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (B'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/Buffy<sup>w105</sup>; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (C''). (D) Quantification de l'expression relative de *dilp8::GFP*. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne d'au moins huit expériences indépendantes. (ANOVA ; p=13%).



permettant la formation de ponts disulfures dans la région luminale de ce dernier [216]. Cette activation d'IP3R induit une libération du  $\text{Ca}^{2+}$  luminal dans le cytosol [217, 218], entraînant l'activation de la kinase CaMKII. Cette dernière peut alors induire l'apoptose en favorisant d'une part l'expression du gène codant le récepteur de mort Fas, et d'autre part la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie *via* l'augmentation de sa concentration en calcium [218].

Nous nous sommes demandé si une voie ERO1- $\alpha$ -IP3R-CAMKII pourrait être impliquée dans l'induction de l'apoptose dans notre modèle de mort induite par un stress chronique du RE chez la drosophile. Cependant, Ero1L, l'homologue d'ERO1- $\alpha$  chez la drosophile, aurait essentiellement un rôle dans la signalisation Notch. En effet Ero1L est requis pour que Notch puisse quitter le RE et rejoindre la membrane plasmique. De plus, sa perte de fonction phénocopie celle de Notch [398]. Son rôle n'a donc pas été étudié dans notre système. L'implication dans notre système de l'autre PDI de drosophile a été testée. L'hétérozygotie pour des pertes de fonction ou des déplétions de PDI, IP3R, CAMKII ne modulent pas la répartition des phénotypes d'échancrures (Tableau 1) et par conséquent ne semblent pas moduler l'apoptose induite par la surexpression de *Psn*. Ces résultats sont renforcés par le fait que la déplétion de Nox, qui est impliquée dans le rétrocontrôle positif de cette voie chez les mammifères [399], n'a également pas d'effet (Tableau 1). Néanmoins, cette voie pourrait exister car la surexpression de CamKII tout comme un allèle de *Pdi* qui pourrait se comporter comme une surexpression induisent un décalage significatif des phénotypes d'échancrures vers les phénotypes les plus forts (Tableau 1). L'absence d'effet des différentes pertes de fonction pourrait provenir d'un effet trop faible des ARNi utilisés ou d'un effet trop faible de l'hétérozygotie des mutations utilisées sur l'activité de cette voie. Nous ne pouvons donc pas pour le moment conclure sur l'implication de cette voie.

En conclusion, nos résultats préliminaires ne permettent pas de montrer que les voies classiquement activées par la branche PERK/ATF4 chez les mammifères sont nécessaires pour induire l'apoptose dans notre modèle.

### **2.1.2.3. Implication de Ref(2)P dans la formation d'agrégats de Psn**

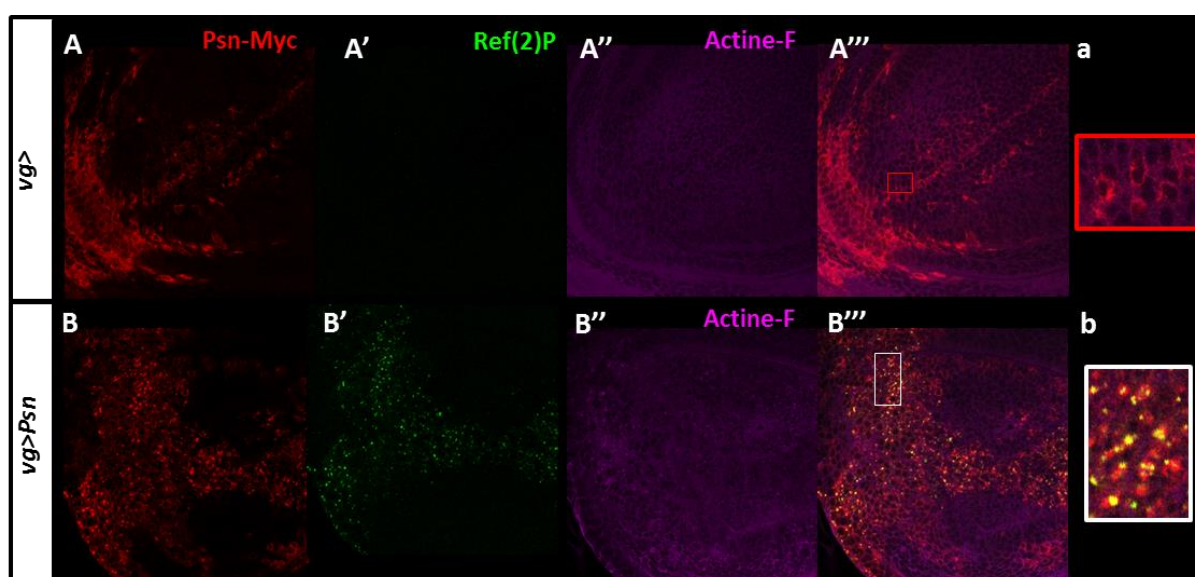
L'agrégation cytoplasmique de protéines est associée à un stress du RE dans différentes maladies, telles les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington [133, 151, 400].



Gènes	Mutations/RNAis	n	p	Effets
<i>Pdi</i>	<i>P{TRiP.JF02874}attP2</i>	811	87%	pas d'effet
	<i>P{EPgy2}Pdi<sup>EY08113</sup></i>	656	<10 <sup>-5</sup>	aggravateur
<i>Itp-R83a</i>	<i>P{TRiP.JF01957}attP2</i>	263	31%	pas d'effet
	<i>Itp-r83A<sup>90B.0</sup></i>	713	20%	pas d'effet
	<i>Mi{ET1}Itp-r83A<sup>MB03611</sup></i>	869	70%	pas d'effet
<i>CaMKII</i>	<i>P{TRiP.JF03336}attP2</i>	841	13%	pas d'effet
	<i>P{UAS-CaMKII.R3}2</i>	604	<10 <sup>-4</sup>	aggravateur
<i>Nox</i>	<i>P{TRiP.HMS00429}attP2</i>	618	9%	pas d'effet

**Tableau 1: L'apoptose induite par un stress du RE dépendant de la surexpression de *Psn* ne semble pas contrôlée par la voie Pdi-IP3R-CaMKII.**

Effet de l'hétérozygotie pour des mutants ou de la déplétion de protéines sur la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. (n=nombre minimum d'individus sur l'ensemble de trois expériences indépendantes. Test statistique=ANOVA)



**Figure 40 : La surexpression de *Psn* provoque son agrégation.**

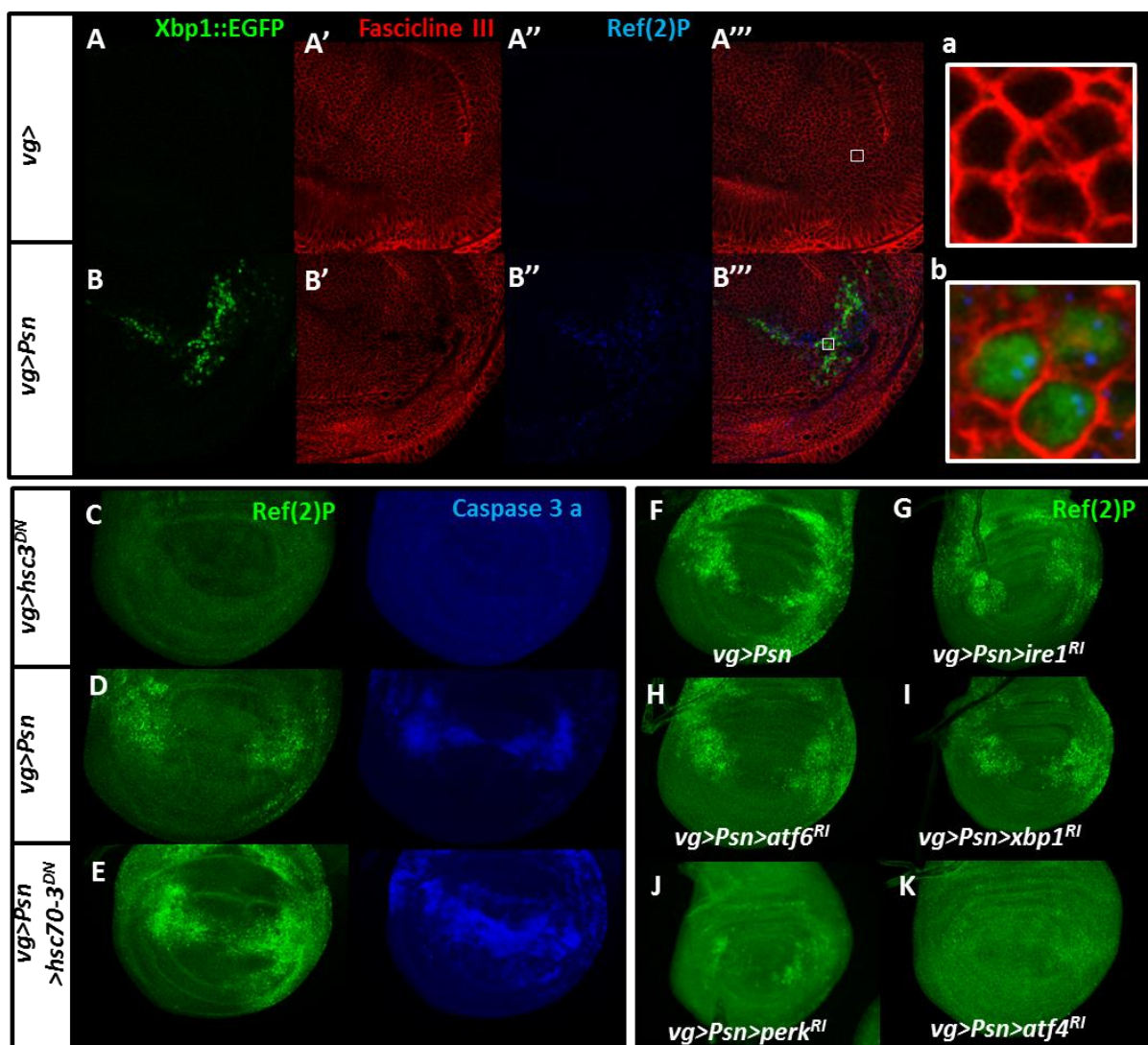
Immunomarquage anti-Myc (rouge), anti-Ref(2)P (vert) et marquage à la phalloïdine (magenta) permettant de mettre respectivement en évidence l'expression de la protéine de fusion Psn-Myc (A,B), Ref(2)P (A',B') et l'actine filamenteuse (A'',B'') dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; UAS-Psn-myc/+* (A-a''') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Psn-myc/+* (B-b'''). (a''',b''') Grossissement de la zone encadrée en rouge dans A''' et en blanc dans B''' qui correspondent à la superposition des différents marquages.

Le stress du RE a été décrit comme étant une conséquence de l'inhibition du protéasome par les agrégats cytoplasmiques [401-403], mais il peut également être à l'origine de la formation de ces derniers [400, 404].

La surexpression de la préséniline dans le disque imaginal d'œil aboutissant à son agrégation [8], nous nous sommes demandé s'il en est de même dans le disque imaginal alaire. L'utilisation d'une forme de Psn pour laquelle un épitope Myc (Psn-Myc) est inséré dans la boucle hydrophile cytoplasmique située entre les domaines transmembranaires 6 et 7 permet de détecter son expression [122]. La détection de cette forme étiquetée montre qu'en absence de surexpression, la préséniline est localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules, qui est mise en évidence par la détection de l'actine filamenteuse (Figure 40A-a'''). La surexpression de *Psn* modifie la distribution de la préséniline qui n'est plus seulement localisée au niveau de la membrane plasmique mais est également présente sous la forme d'un marquage ponctiforme cytosolique (Figure 40BB''-b'''). Ce dernier pourrait correspondre à des agrégats de Psn.

Un marqueur de l'agrégation protéique chez la drosophile est Ref(2)P. Cette protéine est l'homologue de p62, un adaptateur de l'autophagie qui agit comme une protéine cargo en dirigeant les protéines polyubiquitinylées vers les vésicules d'autophagie en formation. [405, 406]. Nous nous sommes donc demandé si Ref(2)P peut être retrouvée au niveau des zones d'accumulation cytosolique de Psn. En absence de stress, Ref(2)P n'est pas détectable dans le disque imaginal d'aile (Figure 40A'). Par contre, la surexpression de *Psn* induit un marquage Ref(2)P (Figure 40B') qui colocalise avec Psn dans le cytosol (Figure 40B'''-b'''). Ce résultat renforce donc l'hypothèse que la surexpression de *Psn* induit la formation d'agrégats protéiques.

Après avoir vérifié que ces agrégats sont bien présents au niveau des cellules activant l'UPR mise en évidence par la détection de l'expression de *xbp1::EGFP* (Figure 41A-b'''), nous nous sommes demandé si leur formation est une cause ou une conséquence de l'UPR. Afin de tester si l'UPR peut être à l'origine de l'agrégation protéique, nous avons bloqué cette réponse en amont en exprimant un transgène codant une forme dominante négative de l'homologue de la chaperonne BiP Hsc70-3, Hsc70-3<sup>K97S</sup> [407]. Une augmentation du marquage Ref(2)P et de l'activation de la caspase Dronc a été observée (Figure 41D,E) lorsque *Psn* est surexprimé en présence de la forme dominante négative de Hsc70-3, qui n'a pas d'effet seule (Figure 41C). Pour confirmer et compléter ce résultat, des composants des trois voies de l'UPR ont été déplétés par l'expression d'ARNi spécifiques. La déplétion d'IRE1 (Figure 41G), d'ATF6 (Figure 41H) ou de XBP-1 (Figure 41I) ne modifie pas le marquage Ref(2)P, ce qui suggère



**Figure 41 : La voie PERK/ATF4 de l'UPR régle l'agrégation de Psn.**

(A,B) La détection de la GFP permet de mettre en évidence l'expression du gène rapporteur *xbp1::EGFP* (vert). La Fascicline III (rouge, A',B') qui permet de visualiser la membrane plasmique et Ref(2)P (bleu, A'',B'') sont mises en évidence par immunomarquage dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; UAS-xbp1::EGFP/+* (A-a) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-xbp1::EGFP/+* (B-b). (a'',b'') Grossissement des zones encadrées en blanc dans A''' et B''' qui correspondent à la superposition des différents marquages dans ces deux conditions. (C-D) Les agrégats protéiques sont identifiés par un immunomarquage anti-Ref(2)P (vert) et les cellules apoptotiques sont mises en évidence par un immunomarquage anti-caspase 3 activée (bleu) dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+; UAS-hsc70-3<sup>DN</sup>/+* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (D) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hsc70-3<sup>DN</sup>/+* (E). (F-Q) Détection des agrégats protéiques par un immunomarquage anti-Ref(2)P dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (F), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-ire1-ARNi* (G), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-atf6-ARNi* (H), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-xbp1-ARNi* (I), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-perk-ARNi* (J) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-atf4-ARNi* (K).

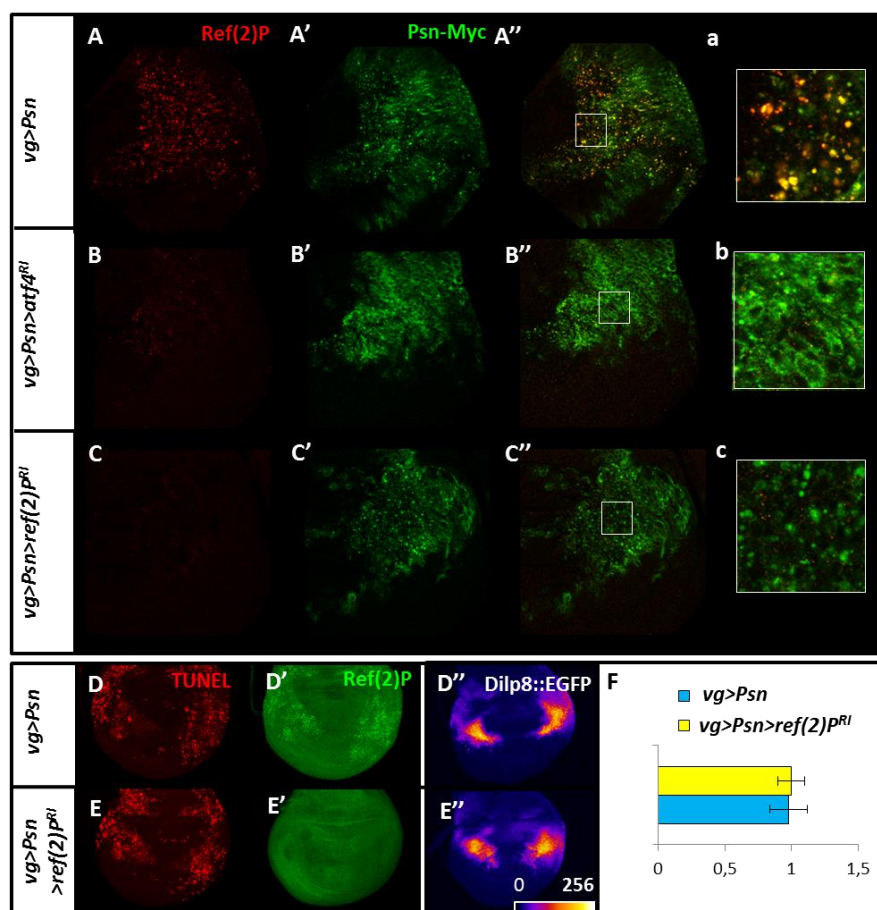
que les branches IRE1 et ATF6 ne sont pas impliquées dans l'établissement de ces agrégats protéiques. A l'opposé, une réduction du marquage Ref(2)P est observée suite à la déplétion de PERK (Figure 41J) et d'ATF4 (Figure 41K). La voie ATF4 semble donc nécessaire à la formation d'agrégats positifs pour Ref(2)P suite au stress chronique du RE.

Une étude récente a mis en évidence que *p62* est une cible transcriptionnelle directe d'ATF4 et de CHOP chez les mammifères [408]. Or le gène *ref(2)P* possède également un site putatif de fixation d'ATF4 (5'-RTTRCRTCA-3') dans sa région promotrice chez la drosophile. La réduction observée du marquage Ref(2)P pourrait donc être due à cette régulation putative. Afin de savoir si la baisse du nombre d'agrégats marqués par Ref(2)P reflétait une baisse de l'agrégation de Psn, nous avons observé directement la quantité d'agrégats de Psn suite à la déplétion des composants de la voie PERK/ATF4. Une réduction des agrégats d'une forme étiquetée Psn-Myc confirme qu'ATF4 inhibe bien la formation des agrégats protéiques induits par la surexpression de *Psn* (Figure 42A-b''). Cette diminution du nombre d'agrégats (Figure 42B') est corrélée à la diminution de la quantité de Ref(2)P (Figure 42B). La branche PERK/ATF4 de l'UPR régule donc l'établissement des agrégats de Psn dans notre modèle.

Ref(2)P pouvant jouer un rôle majeur dans la formation d'agrégats protéiques [405], nous avons testé si Ref(2)P est impliqué dans leur établissement dans notre modèle. La déplétion de Ref(2)P par l'expression d'un ARNi dont l'efficacité est validée (Figure 42C), ne modifie pas la quantité d'agrégats de Psn-Myc (Figure 42C'-c'') comparé au contrôle (Figure 42A'-a''). Ref(2)P ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans l'établissement des agrégats dans notre modèle.

Nous nous sommes également demandé si Ref(2)P ne pourrait pas être un intermédiaire entre la branche PERK/ATF4 et, soit l'activation de la voie de l'apoptose, soit les mécanismes de régénération médiés par la voie JNK. La détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL montre que la déplétion de Ref(2)P (Figure 42D',E') ne modifie ni l'apoptose (Figure 42D,E) ni l'expression de *dilp8* (Figure 42D'',E'',F) suite à la surexpression de *Psn*, ce qui se traduit par une absence de modification de la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* (Tableau 2). Ref(2)P ne semble donc impliquée ni dans la régulation de l'apoptose induite par la voie PERK/ATF4, ni dans l'activation de la voie JNK. Par conséquent, bien que retrouvée au niveau des agrégats protéiques, Ref(2)P ne semble pas jouer un rôle majeur dans notre modèle. D'après ces différents résultats, la quantité de cellules en apoptose semble corrélée à la quantité d'agrégats protéiques (Figure 41C-E et Figure 42B), ce qui suggère que les agrégats protéiques résultant





**Figure 42 : Ref(2)P ne module pas l'agrégation protéique médiée par la branche PERK/ATF4 de la réponse UPR.**

Immunomarquage anti-Ref(2)P (rouge, A,B,C) et anti-Myc (vert, A',B',C') permettant de détecter la protéine de fusion Psn-Myc dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Psn-myc/+* (A-a''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-Psn-myc/UAS-atf4-ARNi* (B-b'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-ref(2)p-ARNi/UAS-Psn-myc* (C-c''). (a'',b'',c'') Grossissements respectifs des zones encadrées en blanc en A'', B'' et C'' qui correspondent à la superposition des différents marquages dans les différentes conditions. (D-E') Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL (rouge, D,E) et immunomarquage anti-Ref(2)P (Vert, D',E') dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (D-D') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-ref(2)P-ARNi/+* (E-E'). (D'',E'') Intensité de détection de la GFP dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/+* (D'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8<sup>M100727</sup>/UAS-ref(2)P-ARNi* (E''). (F) Quantification de l'expression relative de *dilp8::GFP*. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne d'au moins cinq expériences indépendantes (ANOVA ; p=91%).

Gènes	Mutations/ARNi	n	p	Effets
<i>ref(2)P</i>	<i>P{TRiP.HMS00938}attP2</i>	830	43%	pas d'effet
	<i>P{TRiP.HMS00551}attP2</i>	720	67%	pas d'effet

**Tableau 2 : La déplétion de Ref(2)P ne modifie pas les phénotypes d'échancrures.**

Effet de la déplétion de Ref(2)P sur la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. n=nombre minimal d'ailes sur l'ensemble de trois expériences indépendantes. Test statistique=ANOVA.

de l'activation de la voie PERK/ATF4 pourraient jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose dans notre modèle. Cette hypothèse n'a pas été testée durant ma thèse.

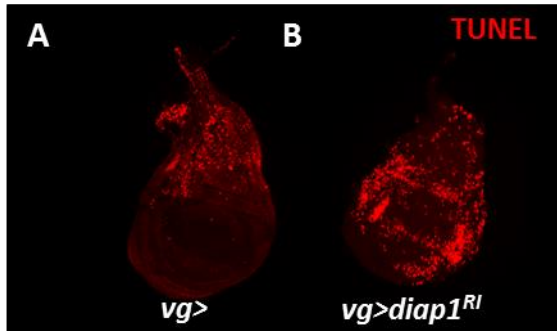
### 2.1.3. Implication des protéines RHG.

Nous avons mis en évidence que la branche PERK/ATF4 favorise l'induction de l'apoptose, au moins, en inhibant la transcription du gène *diap1*. Ce gène est exprimé de façon constitutive dans l'ensemble des cellules du disque d'aile afin d'empêcher l'activation des caspases et le réprimer est suffisant pour induire l'apoptose (Figure 43).

La diminution de la quantité de DIAP1 est communément due à des modifications post-traductionnelles, médiées par les membres de la famille RHG telles que Reaper (Rpr), Hid et Grim, qui provoquent sa dégradation en favorisant son auto-polyubiquitinylation [45, 57, 59]. ATF4 possédant un site putatif de fixation (5'-RTTRCRTCA-3') dans les régions promotrices des gènes *rpr* et *hid*, nous nous sommes demandé si les protéines RHG pourraient également être impliquées dans l'induction de l'apoptose dans notre système, ce qui ajouterait une régulation post-traductionnelle à la régulation transcriptionnelle de *diap1* précédemment décrite.

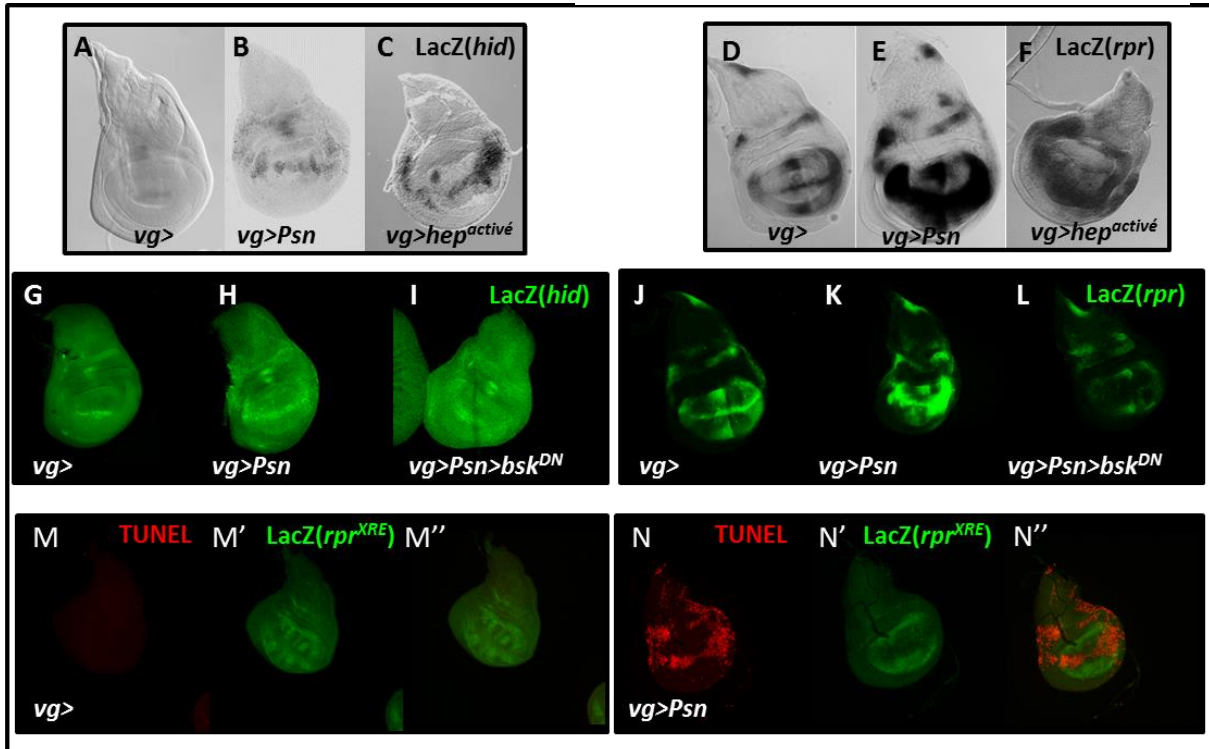
Dans un premier temps, nous avons utilisé les gènes rapporteurs *rpr-lacZ* et *hid-lacZ*. Une augmentation de l'expression de ces gènes rapporteurs, dépendante du stress du RE a été observée par marquage au X-gal (Figure 44A,B,D,E) et immunodétection (Figure 44G,H,J,K).

L'augmentation de cette expression de *rpr* [409] et de *hid* [410] pourrait être une conséquence de l'activation de la voie JNK comme cela a été vu dans différents modèles d'induction de l'apoptose chez la drosophile. De plus, comme cela a été récemment observé [91], l'activation de la voie JNK par l'expression d'une forme constitutivement activée de *hep* (*hep<sup>act</sup>*) est suffisante pour induire l'expression de ces gènes dans le disque imaginal d'aile (Figure 44C,F). Nous nous sommes donc demandé si l'expression de *rpr* et *hid*, après induction d'un stress du RE, peut dépendre de l'activation de la voie JNK ou être régulée directement par ATF4. L'inhibition de la voie JNK par expression du mutant dominant négatif de la JNK Bsk (*Bsk<sup>Dn</sup>*) éteint leur expression (Figure 44I,L) induite par la surexpression de la préséniline (Figure 44H,K). Bien que *hid* et *rpr* contiennent des sites de liaison putatifs d'ATF4 dans leur région promotrice, leur expression semble dépendre



**Figure 43 : La déplétion de DIAP1 est suffisante pour induire de l'apoptose.**

(A,B) Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+* (A) et *vg-GAL4/UAS-diap1-ARNi* (B).



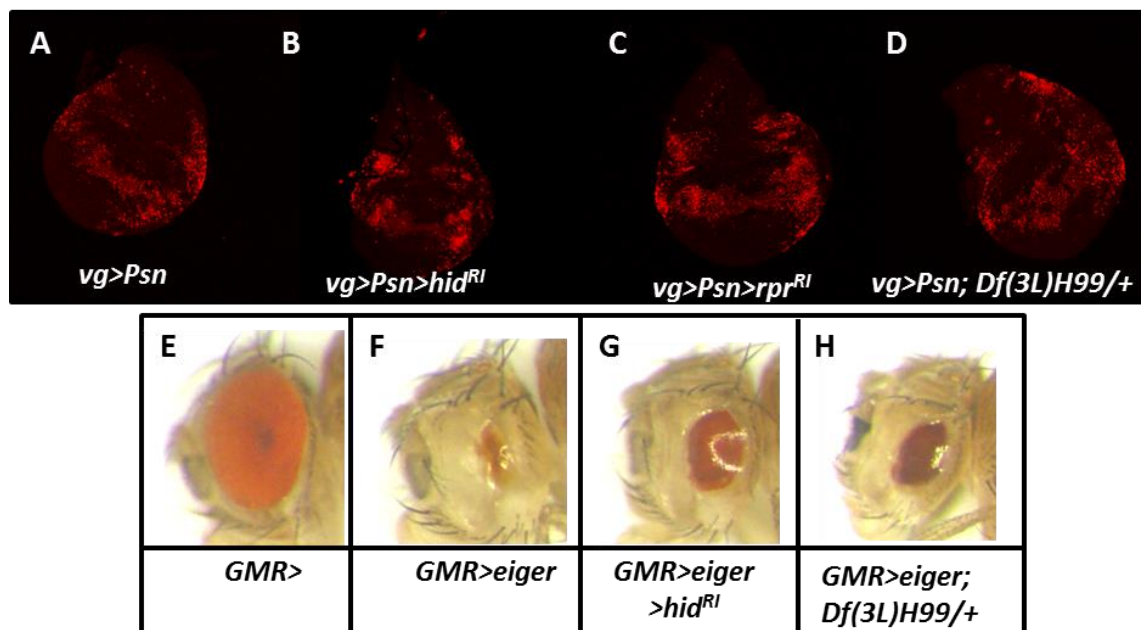
**Figure 44 : L'induction d'un stress du RE induit une expression dépendante de la voie JNK des gènes *rpr* et *hid*.**

(A-F) Détection de l'expression des gènes rapporteurs *hid-lacZ* (A-C) et *rpr-lacZ* (D-F) par un marquage au X-gal dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (B), *vg-GAL4, UAS-hep<sup>a</sup>/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (C), *vg-GAL4/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (D), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (E) et *vg-GAL4, UAS-hep<sup>a</sup>/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (F). (G-L) Détection de l'expression des gènes rapporteurs *hid-lacZ* (G-I) et *rpr-lacZ* (J-L) par un immunomarquage anti- $\beta$ -Galactosidase dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (G), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (H), *UAS-bsk<sup>DN</sup>; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; hid<sup>lacZ</sup>/+* (I), *vg-GAL4/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (J), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (K) et *UAS-bsk<sup>DN</sup>; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; rpr<sup>lacZ</sup>/+* (L). (M-N'') Mise en évidence des cellules en apoptose par un marquage TUNEL (M,N) et de l'expression du gène rapporteur *rpr<sup>XRE</sup>-lacZ* par un immunomarquage anti- $\beta$ -galactosidase (M',N') dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+; rpr<sup>XRE</sup>-lacZ/+* (M-M'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; rpr<sup>XRE</sup>-lacZ/+* (N-N'').

uniquement de la voie JNK après induction d'un stress du RE. La diminution de la quantité de la protéine DIAP1 pourrait donc également dépendre d'une voie PERK/ATF4-JNK-Rpr/Hid. Le facteur de transcription AP-1 de la voie JNK peut interagir avec la région promotrice de *hid* [410] mais pas avec celle de *rpr*. L'activation de *rpr* par AP-1 pourrait donc être indirecte. p53 pourrait être un bon candidat pour ce rôle. Elle peut induire directement l'expression de *rpr* [91] en se fixant dans sa région promotrice [411] et l'activation de la voie JNK par l'expression de *hep<sup>act</sup>* est suffisante pour induire l'expression de p53 [91]. Nous nous sommes donc demandé si l'expression de *rpr* peut dépendre de p53 dans notre système. Pour tester cette hypothèse, un gène rapporteur *rpr<sup>XRE</sup>-lacZ*, qui contient la région génomique nécessaire pour induire l'expression de *rpr* en réponse à l'activation de p53 par des irradiations, a été utilisé [412]. La surexpression de *Psn* n'induit pas l'expression de ce rapporteur (Figure 44M',N'), suggérant que p53 ne serait pas impliquée dans la régulation de *rpr* dans notre système.

L'augmentation du niveau de Rpr et Hid favorise classiquement l'induction de l'apoptose [50, 413, 414]. Nous avons donc testé si ces protéines participent à l'induction de l'apoptose dans notre modèle. La déplétion de Hid (Figure 45B) et Rpr (Figure 45C) par l'expression d'ARNi spécifiques, tout comme la déficience Df(3)H99 (Figure 45D) qui correspond à une délétion d'une région du chromosome III contenant les gènes *hid*, *rpr* et *grim* [415] ne diminuent pas l'apoptose dépendante de la surexpression de *Psn* (Figure 45A) mise en évidence par un marquage TUNEL. Il est à noter que l'ARNi déplaçant Hid et que la déficience Df(3)H99 sont suffisants pour inhiber l'apoptose dépendante de l'expression d'*eiger* dans l'œil sous le contrôle du pilote *GMR-GAL4* (Figure 45E-I) alors que l'efficacité de l'ARNi déplaçant Rpr n'a pas été testée. L'induction de l'apoptose semble donc indépendante de l'expression des protéines Rpr et Hid dans notre système. Ceci est confirmé par le fait que ces différents mutants ne diminuent pas la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* (Tableau 3). Ce résultat n'est pas si surprenant. En effet, nous avons précédemment mis en évidence que la voie JNK régule la transcription de *rpr* et de *hid*. Or, comme nous l'avons décrit dans l'article, la voie JNK n'est pas impliquée dans l'induction de l'apoptose dans notre système. Ce dernier résultat est renforcé par le fait que les déplétions de Slpr (Figure 46B), Msn (Figure 46C) ou Rac1 (Figure 46D), qui sont requis dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans notre système, ne modulent pas l'apoptose dépendante de la surexpression de *Psn* (Figure 46A). Le fait que *rpr* et *hid*, qui sont régulés transcriptionnellement par la voie JNK, ne semblent pas impliqués dans l'induction de l'apoptose dans notre système est donc en accord avec ces résultats.





**Figure 45 : Les protéines RHG ne sont pas impliquées dans l'apoptose dépendante de la surexpression de *Psn*.**

(A-D) Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-hid-ARNi/+* (B), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-rpr-ARNi* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; Df(3L)H99/+* (D). (E-I) Yeux de drosophiles de génotype *GMR-GAL4* (E) *GMR-GAL4; UAS-eiger/+* (F), *GMR-GAL4; UAS-eiger/+; UAS-hid-ARNi/+* (G), *GMR-GAL4; UAS-eiger/UAS-rpr-ARNi* (H), *GMR-GAL4; UAS-eiger/+; Df(3L)H99/+* (I).

Gènes	Mutants/ARNi	n	p	Effets
<i>rpr</i>	P{KK100726}	1164	>5%	pas d'effet
<i>skl</i>	P{KK111864}	898	>5%	pas d'effet
<i>hid</i>	P{GD1673}3	410	15%	pas d'effet
<i>rpr, hid,grim</i>	Df(3R)H99	100	<10 <sup>-3</sup>	aggravateur

**Tableau 3 : La déplétion des protéines RHG ne diminue pas les phénotypes d'échancrures.**

Effet de la déplétion des protéines Rpr, Skl et Hid et de l'hétérozygotie pour la délétion H99 sur la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. n=nombre minimal d'ailes sur l'ensemble de trois expériences indépendantes. Test statistique=ANOVA.

Il semblerait donc que la boucle d'amplification de l'apoptose dépendante de la voie JNK [91] existe dans notre système mais qu'elle soit inefficace pour induire l'apoptose. Ces résultats pourraient s'expliquer par la régulation transcriptionnelle de *diap1* par ATF4 qui pourrait être plus précoce que la potentielle dégradation de DIAP1 médiée par les protéines RHG via l'activation de la voie JNK. De plus, l'allèle perte de fonction *th*<sup>5</sup> et l'allèle gain de fonction *th*<sup>6B</sup> de *diap1* [416] ne modulent pas la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* (Figure 47A,B), suggérant que l'inhibition transcriptionnelle de *diap1* médiée par ATF4 pourrait être totale. Cet ensemble de résultats permet d'élaborer un modèle dans lequel la branche PERK/ATF4 pourrait induire l'apoptose en favorisant l'inhibition transcriptionnelle de *diap1*, en induisant la formation d'agrégats protéiques mais également *via* l'intermédiaire de la voie JNK dans le cas où l'inhibition transcriptionnelle de *diap1* ne serait pas totale (Figure 48).

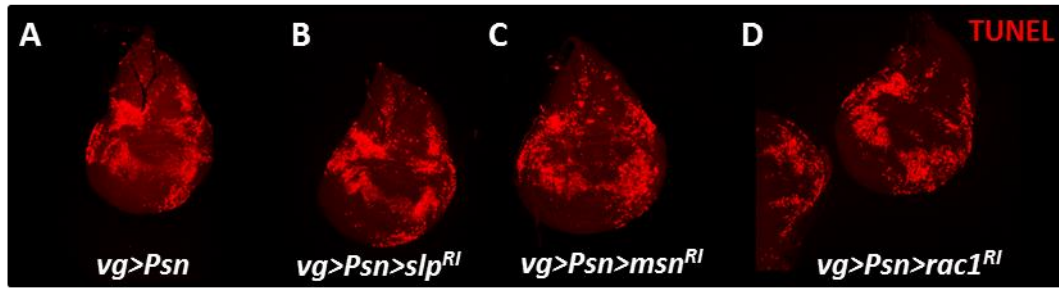
## **2.2.Compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE chez la drosophile**

Nous avons mis en évidence que parallèlement à l'induction de l'apoptose, la branche PERK/ATF4 de l'UPR favorise un retard d'entrée en métamorphose *via* l'expression dépendante de l'activation de la voie JNK de *dilp8* (Figure 48). D'autres mécanismes tels que la prolifération compensatoire [336-339, 343, 348, 352, 417], la coordination de la croissance entre les différents compartiments [359, 418] et les mécanismes de réparation des blessures [302-308, 310-312, 317, 318] peuvent participer au maintien de l'homéostasie tissulaire.

Précédemment, nous avons suggéré que l'induction de l'apoptose dépendante d'un stress chronique du RE dans le domaine *vg* du disque d'aile n'induit pas de prolifération compensatoire [389]. Je détaillerai dans cette première partie les résultats qui nous ont conduits à conclure à l'absence de prolifération compensatoire dans notre modèle.

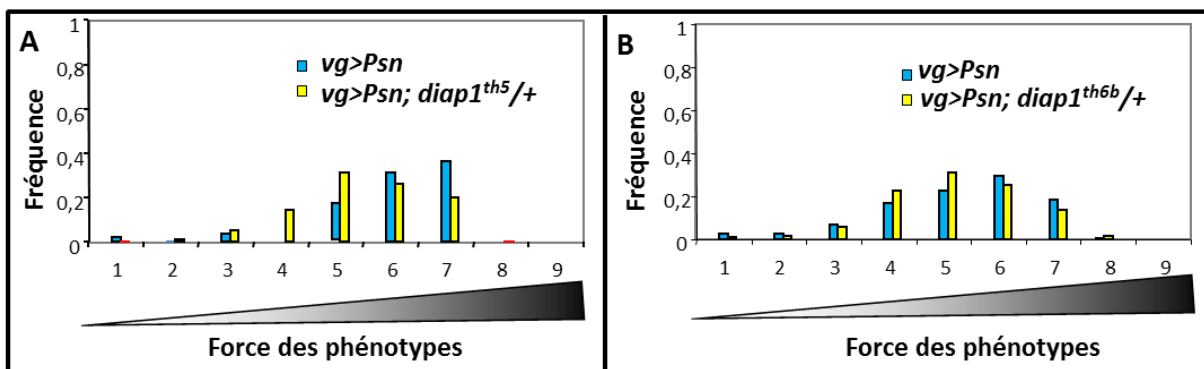
### **2.2.1. Stress du RE et prolifération compensatoire**

Afin de déterminer si l'apoptose induit de la prolifération compensatoire dans notre modèle, nous avons cherché si une augmentation du nombre de cellules dans une des phases du cycle cellulaire était observable. La progression des cellules en phase S a été détectée en utilisant un gène de fusion *pcna ::GFP*. Ce gène, qui code une protéine clé de la machinerie de réplication PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), est exprimé durant la transition G1-S [419].



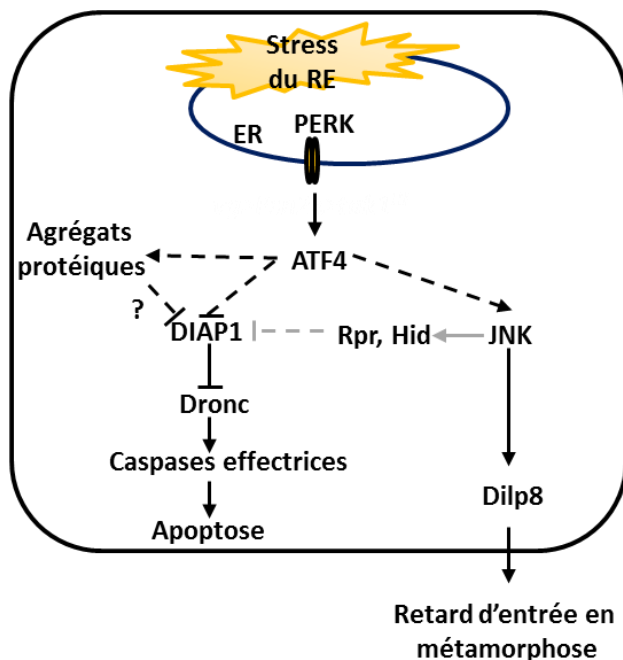
**Figure 46 : La voie JNK n'est pas impliquée dans l'induction de l'apoptose.**

Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-slpr-ARNi* (B), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-msn-ARNi* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+, UAS-rac1-ARNi/+* (D).



**Figure 47 : L'inhibition transcriptionnelle de *diap1* médiée par ATF4 pourrait être totale.**

(A-B) Répartition des phénotypes d'échancrures d'aile de mouches de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1<sup>th5</sup>/+* (A, jaune) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; diap1<sup>th6b</sup>/+* (B, jaune) comparé aux mouches de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A-B, bleu).

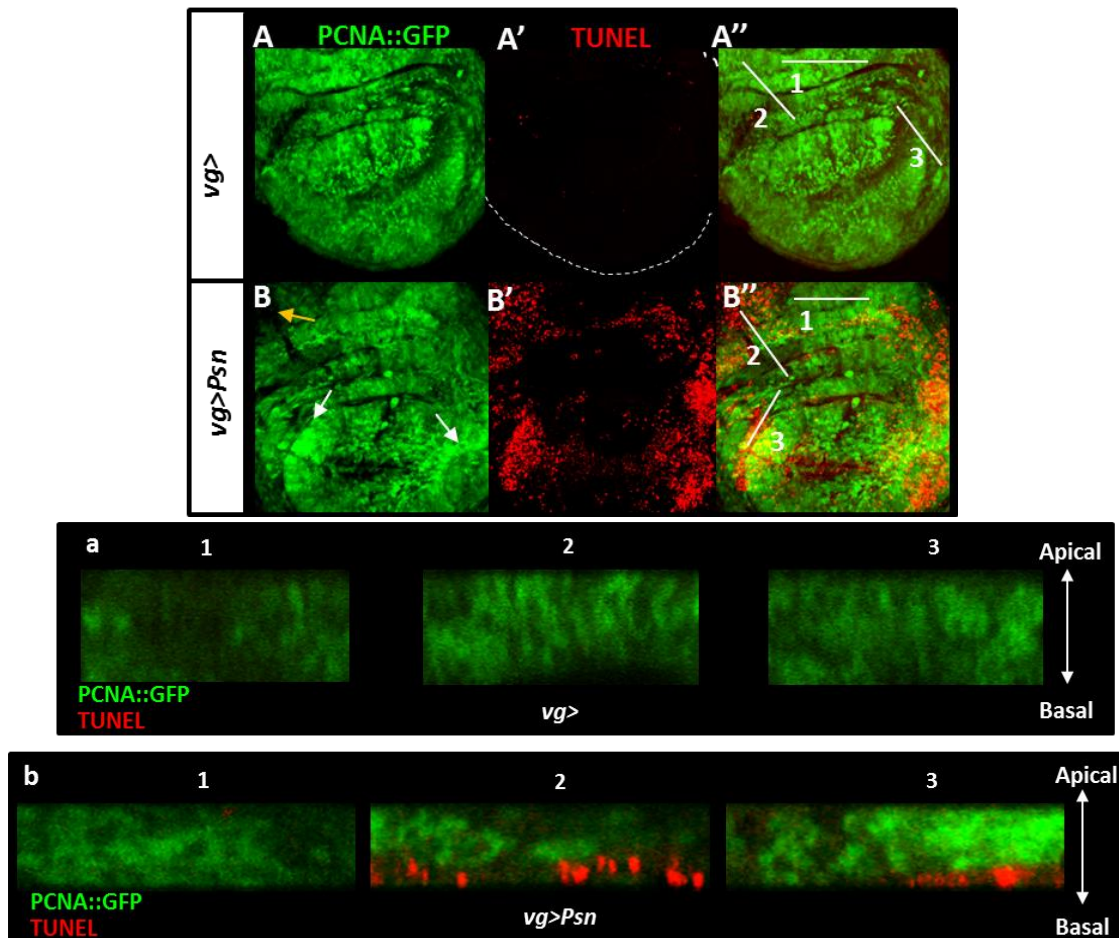


**Figure 48 : Modèle d'induction de l'apoptose par la branche PERK/ATF4 de la réponse UPR.**

La branche PERK/ATF4 de la réponse UPR induit l'activation des caspases en diminuant la transcription de *diap1*. En parallèle, ATF4 active la voie JNK qui, en plus de favoriser l'expression de *dilp8*, régule l'expression de *rpr* et de *hid*. Cette voie JNK/Rpr/Hid pourrait favoriser la dégradation de DIAP1 dans le cas où son inhibition transcriptionnelle serait insuffisante pour déclencher l'apoptose. ATF4 favorise également la formation d'agrégats cytoplasmiques dans le cytosol. Ces agrégats pourraient également avoir un rôle dans l'induction de l'apoptose.

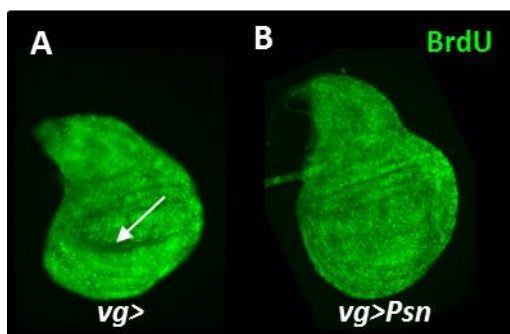
Un disque contrôle en fin de troisième stade larvaire présente au niveau de la frontière D/V une zone de non-prolifération cellulaire (ZNC) où les cellules sont bloquées en phase G1 ou G2 du cycle cellulaire [420]. Cette zone est caractérisée par l'absence de l'expression de *pcna* (Figure 49A). La surexpression de *Psn* dans le domaine *vestigial* induit une augmentation de l'expression de *pcna* (Figure 49B, flèches blanches) dans les régions qui correspondent aux régions latérales de la ZNC dans les disques contrôles. De plus, des coupes transversales montrent que cette augmentation de l'expression de *pcna* concerne des cellules situées en position apicale par rapport aux cellules apoptotiques (Figure 49b, photo 3), et ce par comparaison au disque contrôle (Figure 49a, photo 3) et au contrôle interne (Figure 49b, photo 1) qui correspond à une région du notum où l'apoptose n'est pas induite. Cependant, un fort niveau d'apoptose ne semble pas toujours corrélé à une augmentation de l'expression de *pcna* dans les cellules voisines (Figure 49b, photo 2). En effet, l'augmentation de la prolifération cellulaire, révélée par le rapporteur *pcna::GFP*, semble restreinte à la frontière D/V, montrant que l'apoptose dépendante d'un stress du RE pourrait induire une augmentation de la réplication limitée seulement à certaines régions du disque.

Afin de confirmer ce résultat, des disques imaginaux de larve de troisième stade larvaire ont été cultivés durant 30 minutes en présence de bromodésoxyUridine (BrdU), un marqueur de la réplication. La surexpression de *Psn* induit une augmentation de l'incorporation du BrdU par les cellules situées au niveau de la zone correspondant à la ZNC chez le contrôle (Figure 50A-B). Encore une fois, aucune augmentation des cellules en phase S ne semble être détectable en dehors de cette zone (Figure 50A).



**Figure 49 : L'apoptose induite par le stress du RE induit une augmentation de l'expression de *pcna* dans les cellules situées en position apicale par rapport aux cellules apoptotiques au niveau de la frontière D/V.**

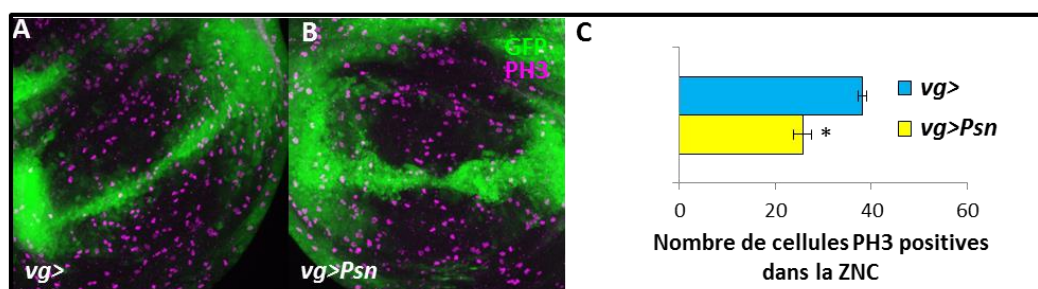
La détection de la GFP (vert) permet de visualiser les cellules en transition G1-S et le marquage TUNEL (rouge) permet de détecter les cellules apoptotiques dans des disques imaginaux de patte de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+ ; pcna::GFP/+* (A-A'',a) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; pcna::GFP/+* (B-B'',b). Les flèches blanches en B indiquent des zones présentant une augmentation de l'expression de *pcna* tandis que la flèche orange indique une zone ne présentant pas de modification de l'expression de *pcna* bien qu'il y ait une quantité importante de cellules apoptotiques. Les traits blancs en A'' et B'' correspondent aux coupes transversales annotées de 1 à 3 réalisées dans ces disques et représentées en a et b respectivement.



**Figure 50 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine *vg* augmente le nombre de cellules en répliation au niveau de la ZNC.**

(A,B) Les cellules en répliation sont mises en évidence par un marquage de l'incorporation du BrdU dans des disques imaginaux de patte de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B). (A) La flèche blanche indique la ZNC.

Si cette augmentation de la réplication est due à de la prolifération compensatoire, une augmentation des cellules mitotiques devrait être également observée. Dans le but de tester cette hypothèse, les cellules mitotiques ont été détectées par un immuno-marquage dirigé contre l'Histone H3 Phosphorylée (PH3). Afin de quantifier le nombre de cellules mitotiques au niveau de la frontière D/V, et tout particulièrement au niveau de la région correspondant à la ZNC (Figure 51A), le domaine d'induction *vg* a été mis en évidence par l'expression de la GFP (Figure 51A-B). Cette quantification (Figure 51C) montre que l'induction d'un stress du RE entraîne une diminution du nombre de cellules en mitose à la frontière D/V (Figure 51B).

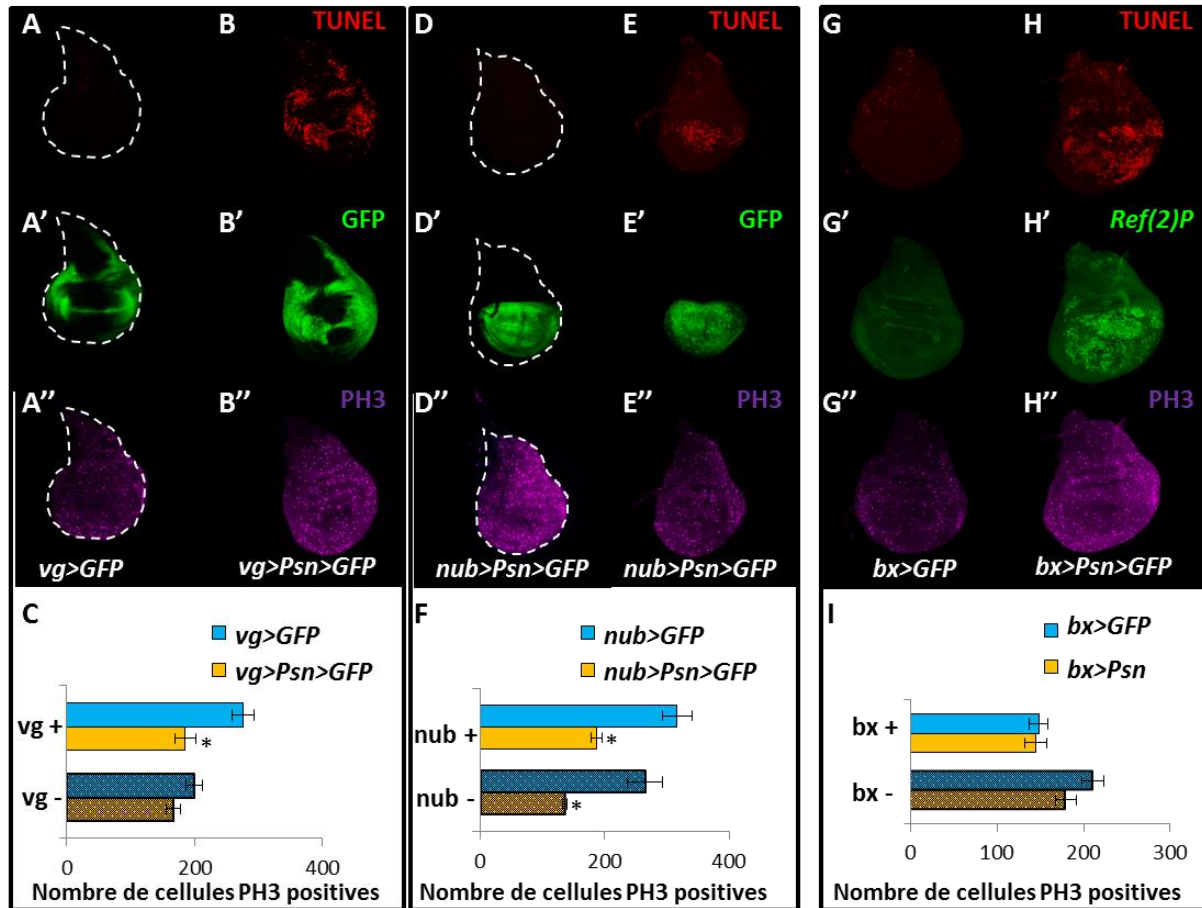


**Figure 51 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine *vg* diminue le nombre de cellules en mitose au niveau de la ZNC.**

(A-B) Détection des cellules en mitose par un immunomarquage dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H3 (PH3) (magenta) et visualisation du domaine d'expression *vg* grâce à l'expression de la GFP (vert) dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4/+* (A) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B). (C) Quantification du nombre de cellules PH3 positives dans la région correspondant à la ZNC des disques imaginaux d'aile. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne (ESM). Les astérisques indiquent une différence significative avec le contrôle ( $n > 7$  ;  $p < 10^{-5}$ ).

L'apoptose dépendante du stress du RE étant induite dans l'ensemble du domaine d'expression *vg* (Figure 52A-A',B-B'), les cellules PH3 positives ont été quantifiées dans l'ensemble de ce domaine en condition de stress du RE (Figure 52B'') et en absence (Figure 52A''). Cette quantification montre que le nombre de cellules PH3 positives subit une diminution significative dans l'ensemble du domaine d'expression *vg* dont les cellules sont marquées par la GFP, tandis que le nombre de cellules en mitose reste constant dans le reste du disque (Figure 52C). L'apoptose dépendante d'un stress du RE ne semble donc pas induire d'augmentation du taux de prolifération au niveau de la zone endommagée. A l'inverse, elle est corrélée à une diminution du nombre de cellules mitotiques dans le domaine d'induction du stress. Une explication pourrait être un arrêt des cellules en phase G2 dû à l'activation par la voie PERK de l'orthologue de drosophile de CHK1 (Checkpoint kinase 1), codé par *grapes*, comme cela a été récemment rapporté [417, 421]. Afin de confirmer ce résultat, cette expérience a été reproduite en utilisant les pilotes *nubbin-GAL4* (*nub>*) (Figure 52D-F) et *bithorax-GAL4* (*bx>*) (Figure 52G-I) qui permettent de surexprimer *Psn* dans la poche du disque. Comme précédemment, les cellules mitotiques sont mises en évidence par un immuno-marquage anti-PH3 (Figure 52D'',E'',G'',H'') tandis que le domaine d'expression est mis en évidence directement par la détection de la GFP (Figure 52D',E') ou indirectement par l'immunodétection de Ref(2)P (Figure 52H'). La quantification du nombre de cellules mitotiques montre qu'il n'y a pas d'augmentation de la prolifération à proximité des cellules apoptotiques, c'est-à-dire au niveau des cellules exprimant la GFP ou Ref(2)P, par rapport au contrôle (Figure 52F,I). Au contraire, la surexpression de *Psn* sous le contrôle du pilote *nub-GAL4* induit une diminution significative du nombre de cellules mitotiques dans le domaine d'expression mais également dans le reste du disque. L'expression de *Psn* dans le domaine d'expression de *bx* n'a pour sa part aucun effet significatif sur le taux de prolifération dans l'ensemble du disque. L'apoptose induite par un stress du RE aurait donc tendance à diminuer la prolifération au sein du domaine d'expression même si l'effet n'est pas toujours significatif (Figure 52E,F,I). Ces différents résultats suggèrent que l'apoptose dépendante d'un stress du RE ne déclenche pas d'augmentation du taux de prolifération cellulaire à proximité des cellules apoptotiques, bien qu'il puisse y avoir une augmentation de la réplication.





**Figure 52 : La mort induite par un stress du RE dans le domaine d'expression de *vg*, *bx* et *nub* n'induit pas de prolifération compensatoire.**

(A-B'',D-E'',G-H'') Disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (A-A''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (B-B''), *nub-GAL4/+; UAS-EGFP/+* (D-D''), *nub-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; UAS-EGFP/+* (E-E''), *bx-GAL4/+* (G-G'') et *bx-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (H-H'') où le domaine d'expression est détecté grâce à l'expression de la GFP (vert, A',B',D',E') ou par un immunomarquage dirigé contre Ref(2)P (vert, G',H'). Les cellules apoptotiques sont mises en évidence par un marquage TUNEL (rouge, A,B,D,E,G,H) et les cellules en mitose sont détectées par un immunomarquage anti-Phospho-Histone 3 (PH3) (magenta,A'',B'',D'',E'',G'',H''). (C,F,I) Quantification du nombre de cellules PH3 positives dans les disques issus des larves des différents génotypes. Les barres pleines correspondent au nombre de cellules positives pour le marquage PH3 dans les différents domaines d'expression et les barres hachurées correspondent au nombre de cellules positives pour le marquage PH3 dans les compartiments adjacents à ces domaines. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne pour au minimum 7 disques imaginaux d'aile (ESM). Les astérisques indiquent une différence significative avec le contrôle (ANOVA;  $p < 5\%$ ).



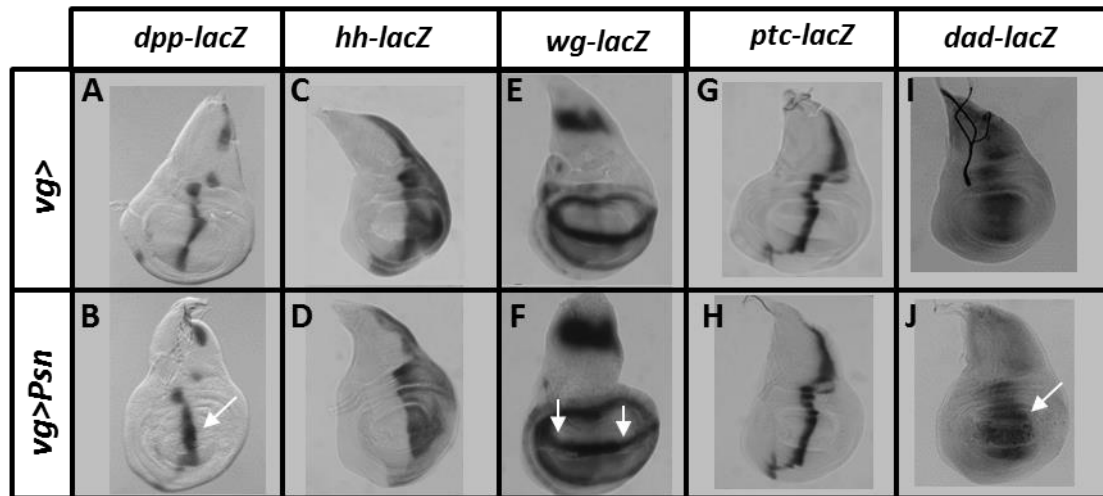
Les différents modèles d'étude de la prolifération compensatoire ont mis en évidence que l'expression ectopique des morphogènes Dpp, Wg [339-342] et Hedgehog [346] par les cellules apoptotique, ou par leurs voisines [349], est responsable de l'augmentation du taux de prolifération localisé à proximité des cellules apoptotiques. Afin de renforcer nos résultats, nous avons testé si l'apoptose dépendante d'un stress du RE peut induire une expression ectopique de ces mitogènes.

Des rapporteurs *wg-lacZ*, *hh-lacZ* et *dpp-lacZ* ont été utilisés afin de mettre en évidence l'expression de ces gènes par un marquage au X-gal. En absence de stress, *dpp* est exprimé par une bande de cellules du compartiment antérieur qui bordent la frontière A/P (Figure 53A), *hh* est exprimé par les cellules du compartiment postérieur (Figure 53C) et *wg* est exprimé dans les cellules adjacentes à la frontière D/V, au niveau de deux anneaux à la limite entre la poche et la charnière du disque et également dans une région du notum (Figure 53E). L'induction d'une apoptose dépendante du stress du RE au niveau du domaine *vg* n'entraîne aucune expression ectopique de ces morphogènes (Figure 53B,D,F). Ces résultats montrent que les cellules apoptotiques, ainsi que leurs cellules voisines mitotiques, n'induisent pas l'expression des principaux mitogènes impliqués dans l'induction de la prolifération compensatoire. Ces résultats sont donc en accord avec l'absence d'augmentation du taux de prolifération observée précédemment. *dpp* est normalement exprimé par une fine bande de cellules du compartiment antérieur qui bordent la frontière A/P. L'induction du stress du RE au niveau du domaine *vg* induit un élargissement de cette bande de cellules dans la région proximale du disque, au niveau de l'intersection entre le domaine d'expression *vg* et le domaine d'expression de *dpp* (Figure 53B, flèche blanche). Cet élargissement est facilement détectable car il localisé à l'endroit où l'expression de *dpp* est la plus faible dans le disque contrôle (Figure 53A).

Afin de déterminer si cette observation est spécifique de l'expression de *dpp* ou bien de la région bordant la frontière A/P, l'expression de *patched* (*ptc*) a été observée en utilisant un gène rapporteur *patched-lacZ*. En effet, tout comme *dpp*, ce gène est fortement exprimé par une bande de cellules située à proximité de la frontière A/P (Figure 53G) [422]. Un marquage au X-gal montre que la surexpression de *Psn* n'induit pas de modification du domaine d'expression du gène rapporteur *ptc-lacZ* comparé au contrôle (Figure 53H), suggérant que l'élargissement serait spécifique à l'expression de *dpp*. Afin de supporter cette conclusion, l'expression de *Dad* (*Daughters against dpp*), une cible transcriptionnelle de la signalisation de Dpp, a été observée grâce à un gène rapporteur *dad-lacZ*. L'observation du marquage X-gal permet de détecter une augmentation de l'expression de ce gène rapporteur uniquement

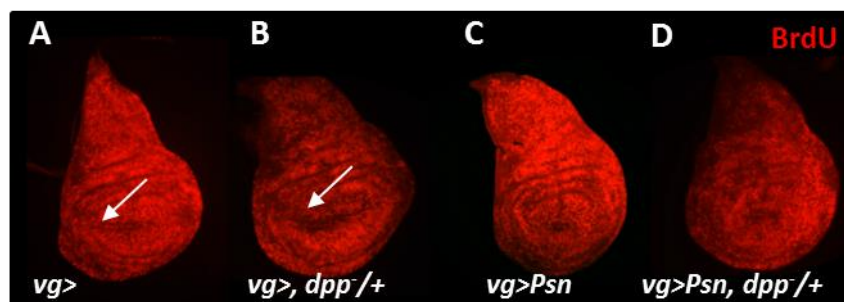
dans la région proximale du disque à l'instar de *dpp* (Figure 53I-J). Ce résultat confirme donc que la surexpression de *Psn* dans le domaine *vg* modifie la signalisation Dpp.

Néanmoins, de légères modifications de l'expression de *dpp* peuvent être détectées. En effet, L'expression ectopique de *dpp* étant connue pour induire une augmentation de la réplication [235, 236, 341], notamment en favorisant la transition G1/S [229-231] par l'augmentation de la quantité de dMyc et de Bantam [247], nous nous sommes demandé si l'augmentation de la réplication observée au niveau de la frontière D/V est dépendante de l'expression de *dpp*. Afin de tester cette hypothèse, l'effet de la réduction du dosage de *dpp* sur l'augmentation de l'incorporation du BrdU au niveau de la frontière D/V a été testé. Une perte de fonction totale de *dpp* induisant une diminution importante de la croissance du disque d'aile [226, 423], un allèle perte de fonction partielle de *dpp* (*dpp*<sup>10638</sup>) qui n'a pas d'effet seul (Figure 54B) a été utilisé. Le contexte hétérozygote pour la mutation perte de fonction partielle de *dpp* ne module pas l'augmentation de la réplication induite par la surexpression de *Psn* au niveau de la ZNC des disques imaginaux d'aile (Figure 54CD). En revanche, une quantification des phénotypes d'échancrures des ailes résultant de ces disques met en évidence que cette réduction du dosage de *dpp* entraîne un décalage significatif des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* vers les phénotypes les plus forts (Tableau 4). Ce résultat a pu être reproduit avec différents mutants perte de fonction de *dpp* (Tableau 4). Ces observations suggèrent donc que Dpp n'est pas impliquée dans l'induction de l'augmentation de la réplication induite par la surexpression de *Psn* mais qu'elle pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie par un mécanisme qui reste à déterminer. En raison de son rôle dans le développement du disque d'aile [226, 240, 241, 423], Dpp pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie tissulaire en assurant un taux de prolifération constant et homogène. L'expression de *dpp* n'est pas la seule à être modifiée suite à la surexpression de *Psn*. En effet, une diminution de l'expression de *wg* a été détectée dans les régions latérales du disque (Figure 53E,F) qui correspondent aux zones où l'apoptose induite est la plus forte. L'élimination de cellules exprimant *wg* au niveau de la frontière A/P pourrait avoir les mêmes effets qu'une perte de fonction de *wg*. Or, il a été montré que la perte de fonction de *wg* durant les dernières 24 à 30 heures du développement du disque imaginal d'aile abolit l'arrêt des cellules en G1 au niveau de la ZNC [420].



**Figure 53 : Les cellules apoptotiques n'expriment pas de mitogènes mais provoquent une modulation de leur domaine d'expression endogène qui pourrait expliquer l'augmentation de la réplication au niveau de la ZNC.**

Le marquage X-gal permet de détecter l'expression des rapporteurs de *dpp*- (A,B), *hh*- (C,D), *wg*- (E,F), *ptc*- (G,H) et *dad-lacZ* (I,J) dans des disques imaginaux d'aile de génotype *vg-GAL4/+; dpp<sup>lacZ</sup>/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dpp<sup>lacZ</sup>/+* (B), *vg-GAL4/+; hh<sup>lacZ</sup>/+* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; hh<sup>lacZ</sup>/+* (D), *vg-GAL4/+; wg<sup>lacZ</sup>/+* (E), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; wg<sup>lacZ</sup>/+* (F), *vg-GAL4/+; ptc<sup>lacZ</sup>/+* (G), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; ptc<sup>lacZ</sup>/+* (H), *vg-GAL4/+; dad<sup>lacZ</sup>/+* (I) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dad<sup>lacZ</sup>/+* (J). Les flèches blanches indiquent des modifications du domaine d'expression comparé aux contrôles.



**Figure 54 : Dpp ne serait pas impliquée dans l'induction de la réplication au niveau de la ZNC.**

Les cellules en réplication sont détectées par un marquage de l'incorporation du BrdU dans des disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (A), *vg-GAL4/dpp<sup>10638</sup>* (B), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (C) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/dpp<sup>10638</sup>* (D). Les flèches blanches désignent la ZNC.

L'élimination des cellules exprimant *wg* au niveau de la frontière A/P pourrait donc être responsable de l'augmentation de la réplication dans cette zone. D'après ces différents résultats, l'apoptose dépendante d'un stress du RE ne semble induire ni prolifération compensatoire, ni expression des principaux mitogènes impliqués dans la régulation de ce mécanisme. L'augmentation de la réplication observée au niveau de la frontière D/V pourrait n'être qu'une conséquence de l'élimination de cellules exprimant *wg*.

L'augmentation de la réplication cellulaire pourrait également être régulée par l'activation de la voie JNK [339, 342, 350, 352]. Nous avons précédemment montré que la voie JNK est activée par l'UPR dans notre système afin de maintenir l'homéostasie tissulaire [389]. Nous nous sommes donc demandé si cette augmentation de la réplication, observée au niveau de la frontière D/V, pouvait être dépendante de la voie JNK. Pour répondre à cette question, nous avons testé si la dérégulation de la signalisation JNK est capable de modifier ce phénotype. La réduction de l'activité de la voie JNK par l'expression de *puc* ainsi que sa sur-activation, en se plaçant en condition hétérozygote pour l'allèle perte de fonction *puc*<sup>E69</sup>, n'a pas d'effet sur la modification de l'incorporation du BrdU induite par la surexpression de *Psn* au sein du disque (Figure 55C,D comparé à 55B). La voie JNK ne semble donc pas être impliquée dans l'augmentation de la réplication observée au niveau de la frontière D/V lorsqu'un stress du RE est induit dans le domaine *vg*. De plus, la déplétion de la MAP3K *Slpr* (Figure 55G) et de *Msn* (Figure 55H), qui sont toutes deux impliquées dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans notre système, ne modifient pas le profil d'incorporation du BrdU. Ces résultats renforcent le fait que la voie JNK n'est pas impliquée dans cette augmentation de la réplication.

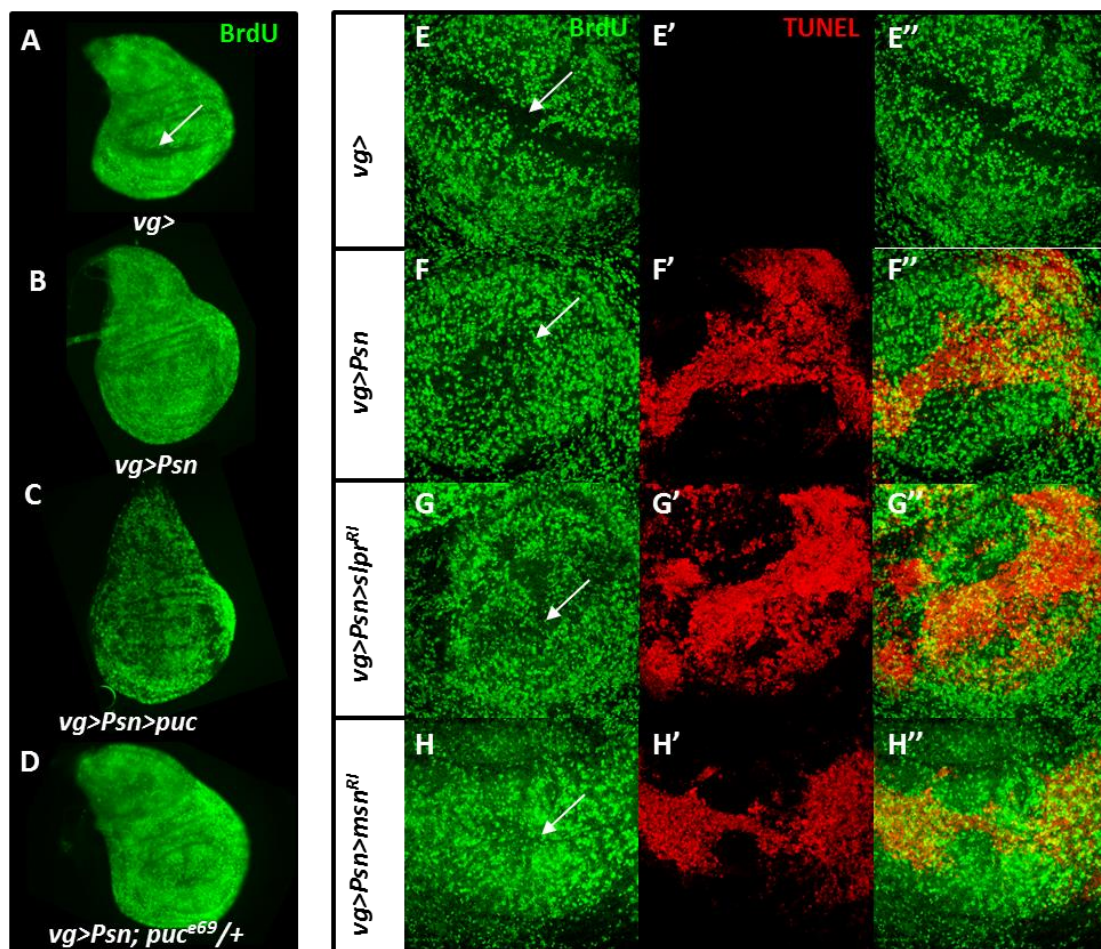
### **2.2.2. Rôle des voies p38, ERK et Hippo dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress du RE**

La voie JNK n'est pas la seule voie impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress. En effet, les deux autres voies MAPK, la voie ERK et la voie p38 sont également susceptibles d'être activées en réponse à différents stimulus tels que des chocs thermiques, des irradiations ou des blessures physiques [424, 425]. Leur rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après une apoptose dépendante du stress du RE a donc été testé. Chez la drosophile, la seule MAPK connue de la voie ERK est Rolled [426]. Sa déplétion par l'expression de différents ARNi ne modifie pas la répartition des phénotypes d'échancrures

Gènes	Mutations/RNAis	n	p	Effets
<i>dpp</i>	<i>dpp</i> <sup>d12</sup>	1010	2%	aggravateur
	<i>dpp</i> <sup>KG08191</sup>	753	<10 <sup>-3</sup>	aggravateur
	<i>dpp</i> <sup>10638</sup>	501	<10 <sup>-3</sup>	aggravateur

**Tableau 4 : Dpp est impliqué dans le processus de maintien de l'homéostasie tissulaire.**

Des mutants hypomorphes de *dpp* décalent significativement les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* bien qu'ils n'aient aucun effet par eux-mêmes. (n= nombre minimal d'ailes, p=ANOVA réalisé sur au moins trois expériences indépendantes).



**Figure 55 : L'apoptose induite par le stress du RE dans le domaine *vg* induit une augmentation de la réplication indépendante de la voie JNK au niveau de la ZNC.**

(A-H'') Les cellules en réplication sont mises en évidence par un marquage de l'incorporation de BrdU (vert) tandis que les cellules en apoptose sont détectées par un marquage TUNEL (rouge) dans des disque imaginaux de patte de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (A,E-E''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B,F-F''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-puc/+* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; puc<sup>e69</sup>/+* (D), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-slpr-ARNi/+* (G-G'') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-msn-ARNi/+* (H-H''). Les flèches blanches désignent la zone correspondant à la ZNC.

induits par la surexpression de *Psn* (Tableau 5). La voie ERK ne semble donc pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE même si l'utilisation d'ARNi ne nous permet pas d'éliminer totalement cette hypothèse. Chez la drosophile, la voie p38 est constituée de trois MAPK homologues, p38a, p38b, p38c, qui sont activées par la MAP2K Licorne. Cette dernière est elle-même activée par la MAP3K MEKK1 [427]. Des résultats contradictoires ont été obtenus pour la déplétion de MEKK1 par différents ARNi. En effet, un même ARNi codé par un transgène inséré sur le chromosome 2 ou 3 a des effets significativement différents sur la répartition des phénotypes d'échancrures. Par ailleurs, un troisième ARNi dont le site d'insertion est connu et dont le fond génétique a pu être correctement testé n'a pas d'effet significatif sur la répartition de ces phénotypes (Tableau 6). Il est donc impossible de conclure sur l'implication de MEKK1 dans notre système. En revanche, la déplétion des effecteurs les plus en aval de la voie p38, à savoir les trois MAPK et Licorne, par différents ARNi ou l'hétérozygotie pour des mutants perte de fonction ne modulent pas la répartition des phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn* (Tableau 6). La voie p38 ne semble donc pas être impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans notre système même si l'utilisation d'ARNi de mutants hétérozygotes ne nous permet pas d'éliminer totalement cette hypothèse. Une autre voie de signalisation candidate au maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress du RE pourrait être la voie Hippo. En effet, cette cascade de phosphorylation, qui réprime la transcription de gènes favorisant la prolifération et la survie, est connue pour réguler l'arrêt de la croissance des organes [257, 258]. Le cœur de la voie Hippo régule négativement le coactivateur de la transcription Yki en inhibant sa translocation au noyau. Lorsque l'inhibition de Yki est levée, il migre au noyau et se lie, entre autre, au facteur de transcription Sd [260]. Ces complexes transcriptionnels induisent l'expression de gènes cibles qui sont impliqués, par exemple, dans l'apoptose (*diap1*), la prolifération (*cycline E*) ou le rétrocontrôle de la voie Hippo (*expanded*). Afin de déterminer si Yki est activé par l'apoptose dépendante du stress du RE, sa localisation subcellulaire a été visualisée par immunomarquage. La surexpression de *Psn* (Figure 56B,b) ne semble pas induire de modification de la localisation subcellulaire de Yki comparé au contrôle (Figure 56Aa). Yki semble demeurer cytoplasmique au niveau de la zone endommagée. Yki ne serait donc pas activé par l'apoptose dépendante du stress du RE.

	Gènes	Mutants/ARNi	n	p	Effets
Voie ERK	<i>rolled</i>	P{KK115768}	313	34%	pas d'effet
		P{GD43124}	412	42%	pas d'effet

**Tableau 5 : La voie ERK ne semble pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.**

La déplétion de la MAPK Rolled ne module pas les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. (n= nombre minimal d'ailes, test statistique= ANOVA réalisée sur au moins deux expériences indépendantes).

	Gènes	Mutants/ARNi	n	p	Effets
MAPKK	<i>Mekk1</i>	<i>P{GD9945}3</i>	793	$<10^{-7}$	aggravateur
		<i>P{GD9945}2</i>	687	$<10^{-9}$	supresseur
		<i>P{TRiP.GL00322}</i>	737	10%	pas d'effet
MAPKK	<i>licorne</i>	<i>P{KK108550}</i>	683	46%	pas d'effet
		<i>P{GD7546}</i>	439	20%	pas d'effet
MAPK	<i>p38a</i>	<i>P{KK111793}</i>	828	52%	pas d'effet
		<i>Mpk2</i> <sup>1</sup>	313	32,50%	pas d'effet
	<i>p38b</i>	<i>P{KK101754}</i>	867	96%	pas d'effet
		<i>p38b KG01337</i>	717	39%	pas d'effet
	<i>p38c</i>	<i>P{KK103439}</i>	385	29%	pas d'effet

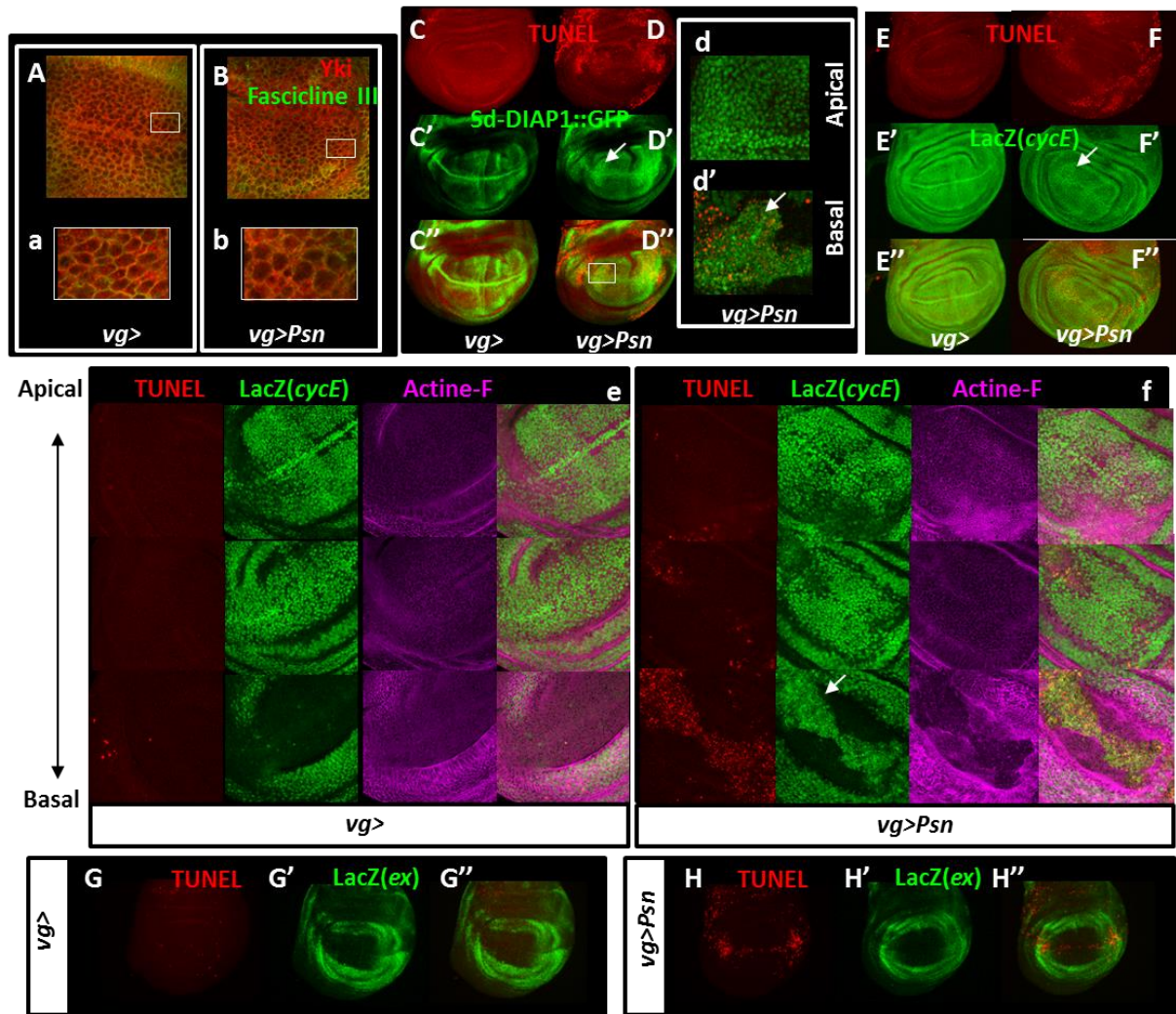
**Tableau 6 : La voie p38 n'est pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.**

La déplétion des MAPKs et de la MAPKK composant la voie p38 chez la drosophile ne module pas les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. Cependant, un doute persiste pour MEKK1. (n= nombre minimal d'ailes, test statistique=ANOVA réalisée sur au moins trois expériences indépendantes)



Afin de confirmer ce résultat, l'expression du gène codant *DIAP1*, par le complexe Sd-Yki a été testé en utilisant le gène rapporteur *sd-diap1::GFP*, qui place la séquence codante de la GFP sous le contrôle de la région régulatrice de *diap1* à laquelle vient se fixer le complexe Yki-Sd [428]. L'induction de l'apoptose induit un élargissement du domaine d'expression de ce rapporteur (Figure 56C'D') uniquement au niveau des régions latérales de la frontière D/V (Figure 56D', flèche blanche) bien que l'apoptose soit induite dans l'ensemble du domaine d'expression de *vg* (Figure 56D). Cependant, les coupes situées au niveau apical (Figure 56d) et de manière suffisamment basale pour ne plus avoir que des corps apoptotiques (Figure 56d') de l'épithélium montrent que l'expansion du marquage GFP est détectable uniquement au niveau des corps apoptotiques qui sont expulsés de l'épithélium. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats : soit Yki n'est activé que tardivement dans les cellules apoptotiques situées dans les régions du disque exprimant le rapporteur, soit cette augmentation du marquage GFP résulte de la dégradation de cellules l'exprimant de façon constitutive. Dans ce dernier cas, Yki ne serait pas activé. Pour répondre à cette question, l'expression des gènes cibles de Yki codant la Cycline E (CycE) et Expanded (Ex) a été visualisée en utilisant les gènes rapporteurs *cycE-lacZ* et *ex-lacZ*. Un faible élargissement de l'expression du rapporteur *cycE-lacZ* (Figure 56E'F', flèche blanche), visualisée par un immunomarquage anti- $\beta$ -galactosidase, est observé uniquement dans les régions latérales de la frontière D/V bien que l'apoptose soit induite dans l'ensemble du domaine d'expression. Les coupes de ces disques imaginaires d'aile réalisées à des niveaux différents de l'axe apico-basal (Figure 56e,f) montrent que l'augmentation du domaine d'expression de ce rapporteur est due à son accumulation au niveau des corps apoptotiques qui sont expulsés de l'épithélium, dont les limites sont détectées par le marquage à la phalloïdine (Figure 56e,f). Ces rapporteurs étant exprimés au niveau de la frontière D/V en absence de stress (Figure 56C'E'), il est difficile de déterminer si Yki est réellement activé dans ces cellules. Pour répondre à cette question, le rapporteur *ex-lacZ* semble le plus approprié. En effet, son domaine d'expression ne recouvre pas celui de *vg* au niveau de la frontière D/V en absence de stress (Figure 56G'). La surexpression de *Psn* n'induit aucune modification de l'expression d'*ex-lacZ*. Cet ensemble de résultats suggère que Yki ne serait pas activé par l'apoptose dépendante du stress du RE.





**Figure 56 : Yki ne semble pas être activée par l'apoptose dépendante d'un stress du RE.**

(A-H) Disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (A,a), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B,b), *vg-GAL4/+ ; sd-diap1::GFP/+* (C-C'), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; sd-diap1::GFP/+* *vg-GAL4/+ ; ex-lacZ/+* (D-D' et d), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; ex-lacZ/+* (C, à droite), *vg-GAL4/+ ; cycE-lacZ/+* (E-E' et e), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; cycE-lacZ/+* (F-F' et f), *vg-GAL4/ex-lacZ* (G-G') et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/ex-lacZ* (H-H'). La détection de la GFP (vert) permet de visualiser l'expression du rapporteur *sd-diap1::GFP* (A). (A-B) Immunomarquage anti-Yki (rouge) et mise en évidence des jonctions septées de la membrane plasmique par une immunodétection dirigée contre la Fascicline III (vert). (C-H) Les cellules apoptotiques sont détectées par un marquage TUNEL (rouge) et la détection de la GFP (vert) permet de visualiser l'expression du rapporteur *sd-diap1::GFP* (C-D) tandis que l'expression des rapporteurs *cycE-lacZ* (E-F) et *ex-lacZ* (G-H) sont mises en évidence par un immunomarquage anti-β Galactosidase (vert). a et b sont des grossissements des zones indiquées par un cadre blanc en A et B. d et d' correspondent aux grossissements de la zone indiquée par un cadre blanc en D', l'un situé au niveau apical de l'épithélium (d), le second au niveau basal (d'). e et f sont grossissements des disques E, F à des niveaux différents de l'axe apical (a)-basal (b). L'actine F y est détectée par un marquage à la phalloïdine. En D', d, F' et f les flèches blanches indiquent des zones où l'expression du rapporteur est modifiée.

Afin de pouvoir conclure sur l'implication de la voie Hippo dans notre système, l'effet de la déplétion par interférence à l'ARN de différents membres de la voie Hippo sur la répartition des phénotypes d'échancrures a été déterminé. La déplétion de Yki conduisant à un phénotype d'échancrures en absence de surexpression de *Psn*, son implication n'a pu être définie par ce test. La déplétion des composants du cœur de la voie Warts, Hippo (Hpo) et Salvador (Sav) ou de Fat et Ex, qui favorisent l'activation du cœur de la voie, ne modifient pas significativement les phénotypes d'échancrures (Tableau 7). L'ensemble de ces résultats suggère que la voie Hippo ne serait pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE même si l'utilisation d'ARNi de mutants hétérozygotes ne nous permet pas d'éliminer totalement cette hypothèse.

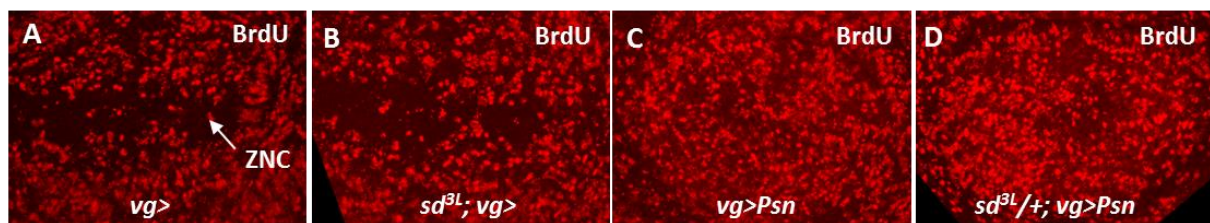
De manière intéressante, la déplétion de Scalloped par hétérozygotie pour des allèles perte de fonction du gène codant ce facteur de transcription, entraîne un décalage significatif des phénotypes d'échancrures vers les phénotypes les plus forts (Tableau 7). Sd serait donc impliqué dans notre système mais indépendamment de la voie Hippo, comme l'indique l'absence d'augmentation de l'expression du rapporteur *sd::diap1-GFP*. La réduction de dosage de *sd* n'affecte pas la répllication observée au niveau de la ZNC lorsque *Psn* est surexprimé (Figure 57). L'effet sur la production de Dilp8 et le temps d'entrée en métamorphose n'a pas été testé. Un rôle de Sd, indépendant de la voie Hippo, tel son interaction avec un autre facteur de transcription comme *vg* [429, 430], pourrait expliquer cette interaction génétique.

Cette étude suggère que les voies ERK, p38 et Hippo ne sont pas impliquées dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE.

Gènes	Mutants/ARNi	n	p	Effets
<i>fat</i>	<i>P{KK101190}</i>	503	38%	pas d'effet
<i>sav</i>	<i>P{KK107562}</i>	128	72%	pas d'effet
<i>ex</i>	<i>P{KK100573}</i>	577	45%	pas d'effet
<i>warts</i>	<i>P{KK101055}</i>	538	35%	pas d'effet
<i>hpo</i>	<i>P{KK101704}</i>	461	45%	pas d'effet
<i>sd</i>	<i>sd<sup>11l</sup></i>	110	>10 <sup>-4</sup>	aggravateur
	<i>sd<sup>3l</sup></i>	126	>10 <sup>-4</sup>	aggravateur

**Tableau 7 : La voie Fat-Hippo ne serait pas impliquée dans l'homéostasie tissulaire après induction d'un stress du RE.**

La déplétion de différents éléments de la voie Hippo ne module pas les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. Le facteur de transcription Sd pourrait quant à lui être impliqué. (n= nombre minimal d'ailes, test statistique=ANOVA réalisée sur au moins trois expériences indépendantes).



**Figure 57 : Scalloped n'est pas impliqué dans la modification de la réplication induite par le stress du RE au niveau de la ZNC.**

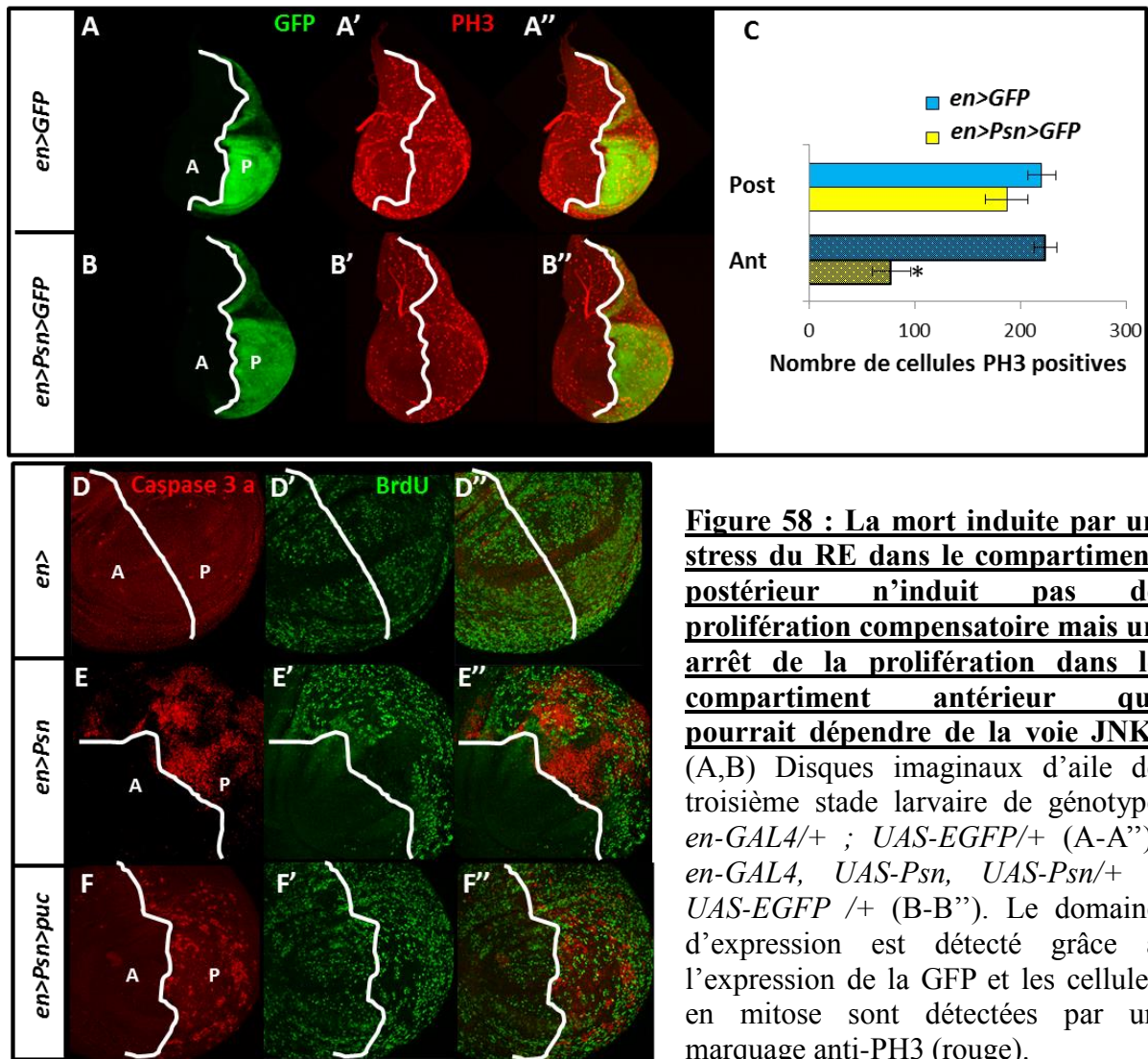
Les cellules en réplication sont détectées par un marquage au BrdU de disques imaginaux de génotype *vg-GAL4/+* (A), *sd<sup>3L</sup>/+ ; vg-GAL4* (B), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (C) et *sd<sup>3L</sup>/+ ; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (D).

### 2.2.3. Coordination de la croissance d'un tissu et voie JNK

Au cours de l'étude de l'implication de la prolifération compensatoire dans notre système, un effet non-autonome de l'apoptose sur la prolifération des cellules situées dans les compartiments adjacents a pu être observé. En effet, l'induction de l'apoptose dans le domaine d'expression de *nubbin* provoque, dans les compartiments adjacents, une diminution du nombre de cellules en mitose (Figure 52F).

Afin de déterminer si cet effet non-autonome cellulaire est spécifique du *nubbin-GAL4*, l'apoptose a été induite dans l'ensemble du compartiment postérieur en utilisant le pilote *engrailed-GAL4* (*en>*). Le nombre de cellules mitotiques a été estimé par un immunomarquage dirigé contre PH3 et les compartiments antérieur et postérieur ont été distingués grâce à l'expression de la GFP sous contrôle d'*en-GAL4* (Figure 58A,B). Cette quantification a montré que l'induction d'un stress du RE dans le compartiment postérieur entraîne une diminution du nombre de cellules mitotiques dans le compartiment antérieur (Figure 58C) d'un facteur trois alors qu'il n'est pas modulé dans le compartiment postérieur. L'effet non-autonome cellulaire est donc retrouvé lorsque l'apoptose est induite dans le domaine postérieur. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par une étude impliquant p53 dans la régulation de la croissance et la prolifération des cellules du compartiment antérieur et donc dans la coordination de la croissance entre compartiments [359].

p53 et la voie JNK étant régulièrement impliqués dans les mêmes mécanismes biologiques tels que l'apoptose [91] ou la prolifération compensatoire [339, 342, 343], nous nous sommes demandé si la voie JNK pouvait être impliquée dans l'effet non-autonome cellulaire de l'apoptose sur la prolifération cellulaire. Pour tester cette hypothèse, l'activité de la voie JNK a été inhibée dans le domaine postérieur en exprimant le gène codant la phosphatase Puc. Ce blocage de la voie JNK lève l'inhibition de la réplication dans le compartiment postérieur, rapportée par un marquage de l'incorporation du BrdU, qui présente désormais un taux de cellules en réplication comparable à celui d'un disque contrôle de même stade de développement larvaire (Figure 58D',E,F'). Néanmoins, l'expression de *puc* conduit également à une réduction significative du nombre de cellules en apoptose dans le compartiment postérieur. (Figure 58D,E,F). En dépit de cette diminution de l'apoptose, les ailes adultes co-exprimant *Psn* et *puc* présentent des phénotypes d'échancrures significativement aggravés par rapport à ceux induits par la surexpression de *Psn* (Figure 59A,B). Ce résultat suggère que l'inhibition de la prolifération dans le compartiment adjacent *via* la voie JNK pourrait favoriser le maintien de l'homéostasie tissulaire.



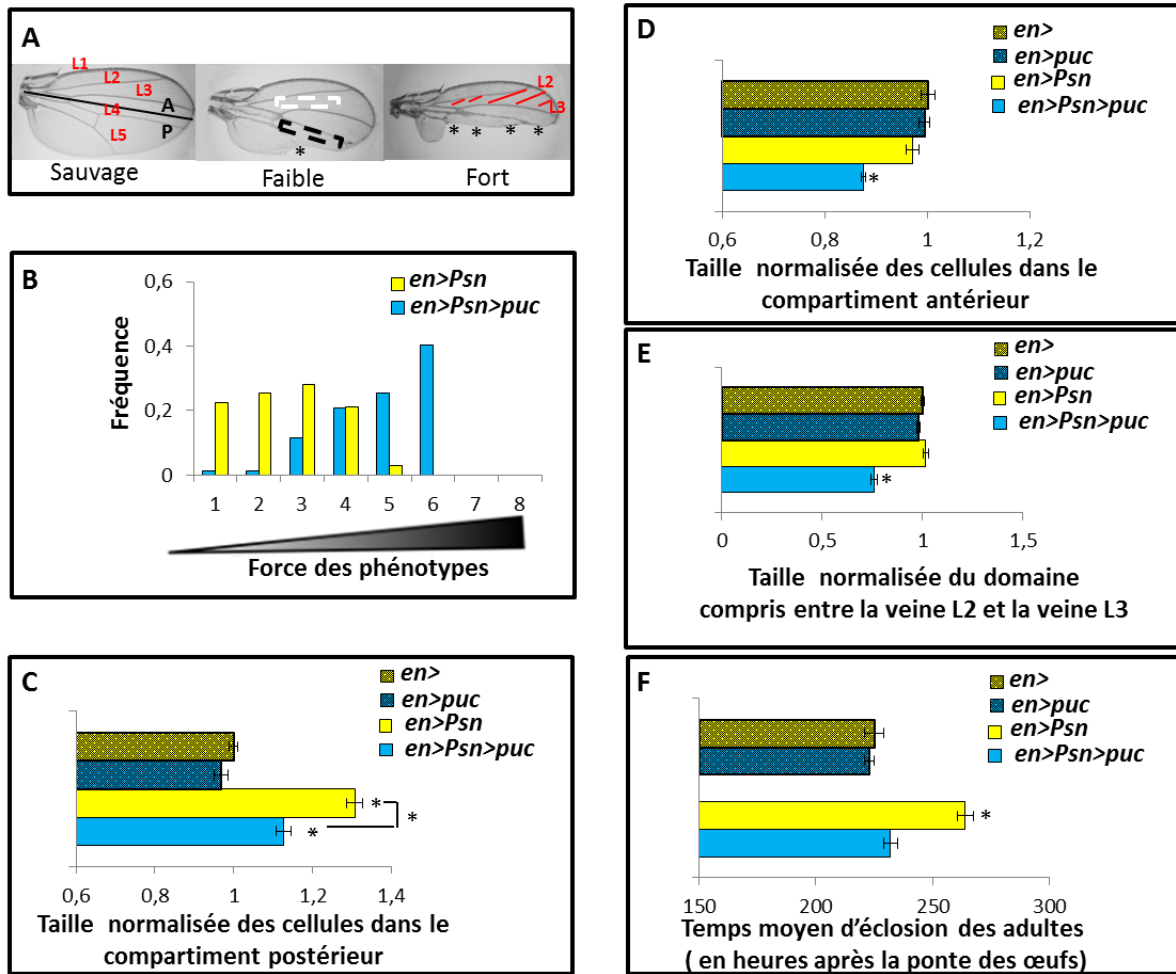
(C) Quantification du nombre de cellules PH3 positives. Les barres pleines correspondent au nombre de cellules PH3 positives dans le compartiment postérieur et les barres hachurées correspondent au nombre de cellules PH3 positives dans le compartiment antérieur. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne (ESM). L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle ( $n=6$  ;  $p<10^{-5}$ ). (D-F) Disques imaginaux d'aile de troisième stade larvaire de génotype *en-GAL4/+* (D-D''), *en-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (E-E''), *en-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-puc/+* (F-F''). Les cellules apoptotiques sont identifiées par un immunomarquage dirigé contre la caspase 3 activée (en rouge), tandis que les cellules en répllication ont incorporé du BrdU (en vert).



p53 coordonnant la taille des compartiments en régulant la taille et le nombre des cellules du compartiment adjacent [359], nous nous sommes donc intéressé aux modifications de ces caractéristiques dans l'aile adulte. Afin de déterminer la taille relative des cellules, la densité cellulaire a été mesurée en comptant le nombre de soies dans une surface prédéfinie des compartiments antérieur et postérieur. En effet, chaque cellule différenciée de l'aile adulte présente une soie. Cette surface est figurée respectivement par un cadre blanc et jaune de taille identique (Figure 59A). L'apoptose induite dans le compartiment postérieur provoque une augmentation significative de la taille des cellules survivantes de ce domaine comparé au contrôle (Figure 59C), alors que la taille des cellules du compartiment antérieur reste inchangée (Figure 59D). En absence de stress, la surexpression de *puc* n'a pas d'effet sur la taille des cellules des compartiments postérieur (Figure 59C) et antérieur (Figure 59D). Cette inhibition de la voie JNK conduit à une réduction de la taille des cellules exprimant *Psn* dans le compartiment postérieur (Figure 59C), suggérant que la voie JNK favoriserait l'augmentation de la taille des cellules dans le compartiment endommagé. Cette inhibition induit également une diminution significative de la taille des cellules du compartiment antérieur (Figure 59D), suggérant que la voie JNK favoriserait de façon non-autonome cellulaire le maintien de la taille des cellules dans le compartiment adjacent au compartiment lésé. La voie JNK semble donc réguler la taille de l'ensemble des cellules de l'aile. Une hypothèse parcimonieuse serait que la voie JNK régulerait l'émission d'un signal affectant l'ensemble des cellules du disque d'aile.

Les conséquences de l'inhibition de la voie JNK sur la taille du compartiment antérieur ont également été évaluées. Pour cela, la surface située entre les veines L2 et L3 (Figure 59A) a été mesurée. La surexpression de *Psn* dans le compartiment postérieur n'induit pas de modification de sa taille (Figure 59E, barre pleine jaune) alors qu'elle est diminuée suite à l'inhibition de la voie JNK (Figure 59E, barre pleine bleue). Cette voie semble donc favoriser le maintien de la taille du compartiment adjacent au compartiment dans lequel est induit un stress.

D'après ces différents résultats, il semble que la voie JNK joue un rôle important dans le maintien de la taille des compartiments antérieur et postérieur du disque imaginal d'aile. Cependant, la question se pose de savoir si ces différentes observations pourraient n'être qu'une conséquence du retard de développement induit par la voie JNK. En effet, la surexpression de *Psn* dans le compartiment postérieur induit un retard du développement dépendant de la voie JNK (Figure 59F).



**Figure 59: La voie JNK pourrait réguler l'équilibre entre le compartiment antérieur et postérieur.**

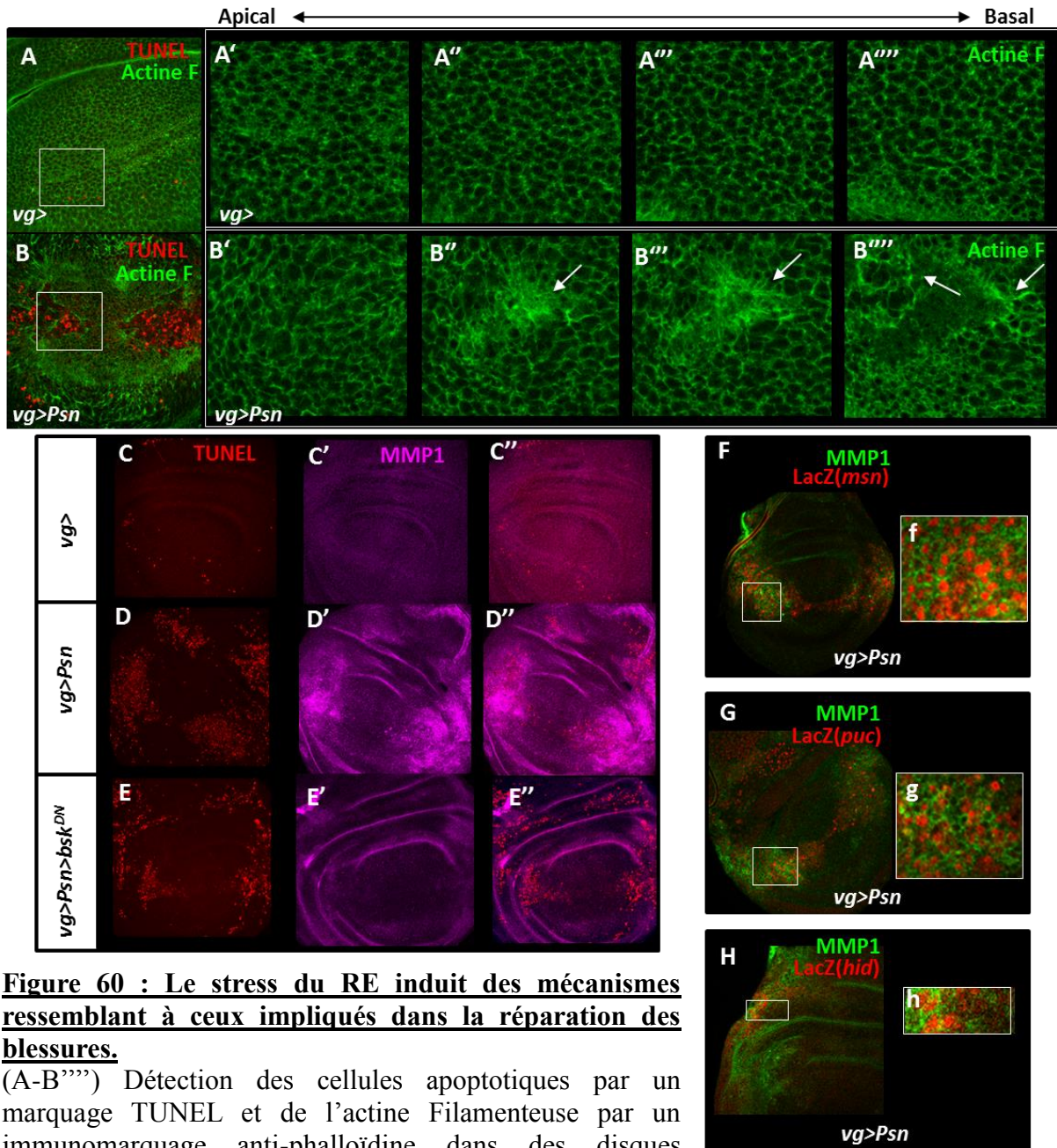
(A) Ailes de mâles adultes de génotype *en-GAL4/UAS-Psn*, *UAS-Psn/+* présentant des phénotypes d'échancrures qui peuvent être classés en fonction du nombre et de la taille des échancrures (astérisque). L1, L2, L3, L4 et L5 correspondent aux veines de l'aile. Les zones déterminées par les cadres correspondent aux zones des régions antérieure (cadre blanc) et postérieure (cadre noir) dans lesquelles le nombre de cellules a été déterminé en (C) et (D). La zone hachurée en rouge correspond au domaine situé entre la veine L2 et la veine L3. (B) Distribution des phénotypes d'échancrures d'aile de génotype *en-GAL4/UAS-Psn*, *UAS-Psn/+* (barres jaunes) et *en-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-puc/+* (barres bleues). La catégorie 1 correspond aux ailes sauvages. Taille normalisée des cellules du compartiment postérieur (C) et antérieur de l'aile (D), taille normalisée du domaine compris entre les veines L2 et L3 de l'aile (E) et temps moyen d'éclosion (F) des mâles adultes de génotype *en-GAL4/+* (barres rayées jaunes), *en-GAL4/+ ; UAS-puc/+* (barres rayées bleues), *en-GAL4/UAS-Psn, UAS-Psn/+* (barres pleines jaunes) et *en-GAL4/UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-puc/+* (barres pleines bleues). (C-F) Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes (C) et de 9 disques issus de trois croisements indépendants (D-F). Les astérisques correspondent aux différences significatives observées entre les contrôles (*en>*) et le génotype indiqué ( $p < 10^{-4}$  ANOVA).

#### **2.2.4. Implication des mécanismes favorisant la réparation des blessures après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE.**

La voie JNK a également été décrite comme régulant la réparation ou la régénération des tissus [311-313]. Nous nous sommes demandé si ces mécanismes ne pouvaient pas être impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante d'un stress chronique du RE. La réparation des blessures est caractérisée par un ensemble de modifications morphologiques. Les cellules bordant la blessure s'allongent et s'orientent de manière à minimiser la quantité de cellules en contact avec la lésion [306]. Le réseau d'actine se réorganise afin de former un câble d'actomyosine [303, 306, 308], des lamellipodes ainsi que des filopodes [302, 306] qui permettent la fermeture de la blessure. Nous nous sommes demandé si l'induction d'une apoptose dépendante d'un stress chronique du RE pouvait induire de telles modifications morphologiques. Afin de répondre à cette question, l'actine filamenteuse (actine F) a été détectée par un marquage à la phalloïdine tandis que les cellules apoptotiques étaient identifiées par un marquage TUNEL (Figure 60A-B'''). L'observation de ces marquages, nous a permis de mettre en évidence que l'induction de l'apoptose par la surexpression de *Psn* induit une réorganisation du faisceau d'actine au niveau de la zone endommagée. En effet, une augmentation de la concentration d'actine F (Figure 60B''-B''', flèches blanches) est observée au niveau des cellules bordant la zone de mort cellulaire.

De nombreuses études ont montré que la voie JNK est un acteur clé de la régulation des modifications du faisceau d'actine. Elle est activée dans une bande de cellules saines plus ou moins larges bordant la blessure [305-307] où elle favorise, entre autres, l'expression du gène codant la métalloprotéase matricielle MMP1, qui est requise pour promouvoir les modifications morphologiques et la migration de ces cellules. Nous avons précédemment rapporté [389] que l'immunomarquage de MMP1 était un marqueur de l'activation de la voie JNK. Voici des expériences complémentaires supportant cette conclusion. En absence de stress, MMP1 n'est pas observé dans la poche du disque d'aile (Figure 60C,C'). La surexpression de *Psn* induit l'accumulation de MMP1 dans le domaine d'induction de l'apoptose (Figure 60D,D'). La réduction de cette production suite à l'inactivation de la voie JNK par l'expression d'un mutant dominant négatif de Bsk montre que la synthèse de MMP1 (Figure 60E,E') est dépendante de la voie JNK dans notre système. Par ailleurs, les marquages anti-MMP1 indiquent que la protéine est localisée en périphérie des cellules





**Figure 60 : Le stress du RE induit des mécanismes ressemblant à ceux impliqués dans la réparation des blessures.**

(A-B''') Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL et de l'actine Filamenteuse par un immunomarquage anti-phalloïdine dans des disques de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (A-A'''), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (B-B'''). (A'-A''') et (B'-B''') correspondent à des coupes horizontales des disques d'aile présentés en (A) et (B) et orientés selon l'axe apical-basal où seul l'actine F est mis en évidence. En B'', B''' et B''', les fleches blanches mettent en évidence une accumulation d'actine F (C-I) Marquage anti-MMP1 associé à un marquage TUNEL (C-E), à un marquage anti-β-Galactosidase mettant en évidence l'expression du rapporteur *msn-lacZ* (F-f), *puc-lacZ* (G-g) ou *hid-lacZ* (H-h) dans des disque imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (D), *UAS-bsk<sup>DN</sup>/Y; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (E), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn<sup>06946</sup>/+* (F,f), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; puc<sup>E69</sup>/+* (G,g), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; hid<sup>LacZ</sup>/+* (H,h). f, g et h correspondent aux grossissements des zones indiquées par un cadre blanc dans F, G et H.

présentant une activation de la voie JNK qui est détectée grâce aux gènes rapporteurs *msn-lacZ* et *puc-lacZ* (Figure 60F,f,G,g). Cette observation est compatible avec le fait que MMP1 est une protéine sécrétée. Elle suggère que *mmp1* est exprimé de façon autonome cellulaire par les cellules activant la voie JNK, or nous avons précédemment mis en évidence que la voie JNK est activée dans les cellules mourantes [389].

Ce résultat est renforcé par le fait que, MMP1, qui peut donc servir de rapporteur de l'activation de la voie JNK, est localisée au niveau des cellules apoptotiques (Figure 60I,i), mises en évidence par la détection du gène rapporteur de l'expression du gène pro-apoptotique *hid*, *hid-lacZ*.

En dépit de cette différence dans la nature des cellules activant la voie JNK, nous nous sommes demandé si les gènes régulés par cette voie durant la réparation des blessures pourraient être impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans notre système. Durant la réparation des blessures, la voie JNK régule l'expression de *mmp1* mais également celle de *mmp2* dont le rôle exact du produit n'a pas encore été décrit dans ce mécanisme [77, 315]. Une autre cible transcriptionnelle connue de la voie JNK est le gène *chickadee*, codant la Profiline, qui régule la formation du câble d'actine [318]. Afin de tester l'implication de ces gènes dans le maintien de l'homéostasie tissulaire dans notre système, un test d'interaction génétique basé sur la modulation des phénotypes d'échancrures induit par la surexpression de *Psn* a été réalisé. La déplétion de MMP1 par l'expression d'un ARNi ne module pas les phénotypes d'échancrures (Tableau 8) alors que cet ARNi est efficace pour abolir la synthèse de MMP1 (Figure 61). La déplétion de MMP2 ne module également pas cette répartition (Tableau 8). Le fait que MMP1 et MMP2 ne soient pas impliquées est renforcé par le fait que la déplétion de TIMP, un inhibiteur de l'activité des métalloprotéases, n'ait également aucun effet sur la répartition de ces phénotypes (Tableau 8) tout comme celle de la Profiline (Tableau 8). Les gènes cibles de la voie JNK impliqués dans la réparation des blessures ne semblent donc pas être requis dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, sous caution de l'efficacité des ARNi pour dépléter ces gènes potentiellement exprimés.

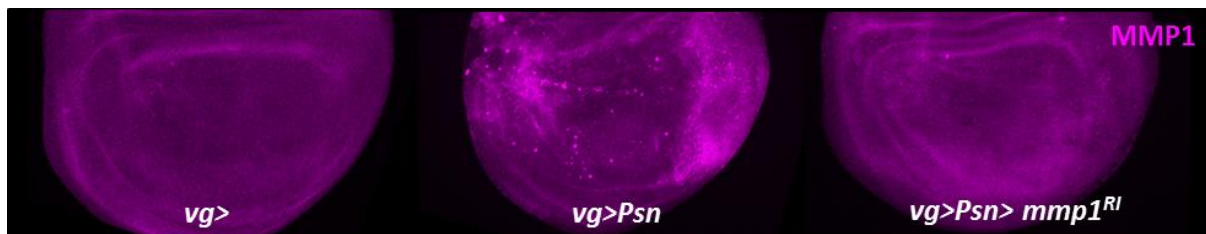
#### **2.2.5. Induction du retard de l'entrée en métamorphose**

Les mécanismes qui permettent aux disques de signaler leur état de développement restent à ce jour très peu connus. Nous avons mis en évidence, comme d'autres équipes, qu'un disque endommagé est capable d'induire un retard d'entrée en métamorphose en favorisant

Gènes	ARNi	n	p	Effets
<i>mmp1</i>	<i>P{KK108894}</i>	411	56%	pas d'effet
<i>mmp2</i>	<i>P{KK104713}</i>	376	90%	pas d'effet
<i>timp</i>	<i>P{KK108268}</i>	301	20%	pas d'effet
<i>chickadee</i>	<i>P{KK112358}</i>	450	41%	pas d'effet

**Tableau 8: Les gènes principaux impliqués dans la réparation des blessures ne semblent pas impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après un stress du RE.**

Tableau récapitulant l'effet de la déplétion par ARNi de protéines impliquées dans la réparation des blessures sur les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. (n=nombre d'individu minimum sur l'ensemble de trois expériences indépendantes. Test statistique=ANOVA)



**Figure 61 : Vérification de l'efficacité de l'ARNi dirigé contre MMP1.**

(A) Marquage anti-MMP1 dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4/+* (à gauche), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (au centre) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/UAS-mmp1-ARNi* (à droite).

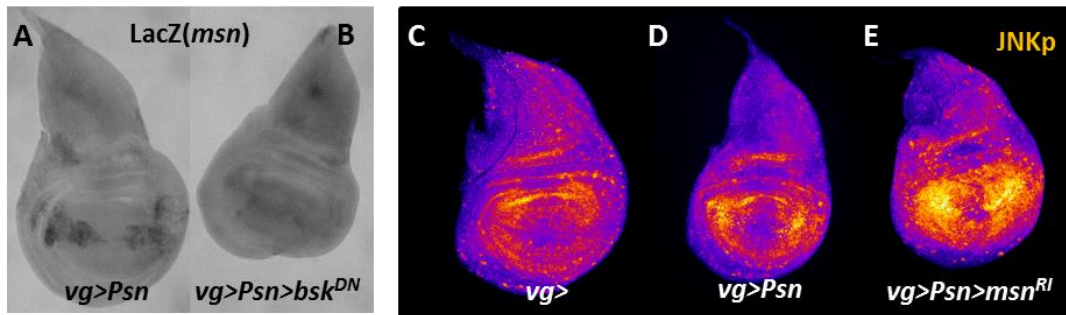
l'expression de *dilp8*. Dilp8 induit alors une diminution de l'expression de PTTH, et donc celle de la synthèse de l'ecdysone [368, 375].

#### **2.2.5.1. Lien entre la voie PERK/ATF4 et la voie JNK.**

Nous avons mis en évidence que la branche PERK/ATF4 de l'UPR régule l'activation de la voie JNK composée de la petite GTPase Rac1, de la MAPKKK Slpr, des MAPKK Hep et Mkk4 et de Bsk, pour induire l'expression de *dilp8*.

Nous avons également mis en évidence un rôle de la MAP4K Msn qui est différent de celui décrit dans la littérature pour la fermeture dorsal de l'embryon [314, 431] ou la voie Eiger/Wengen [85]. En effet, dans ces deux modèles, Msn active la voie JNK. A l'inverse, Msn semble inhiber l'activation de la voie JNK dans notre modèle puisque sa déplétion induit une augmentation de l'expression de *dilp8* [389] et de la phosphorylation de la JNK Bsk (Figure 62D,E), mettant ainsi en évidence une augmentation de l'activation de la voie JNK. Il est intéressant de noter que le gène *msn* est une cible de la voie JNK dans notre système. En effet, la surexpression de *Psn* induit son expression (Figure 62A) de manière dépendante de la JNK (Figure 62B). Il semblerait donc que Msn appartienne à une voie de rétrocontrôle négatif de la voie JNK dans notre système.

Pour le moment, l'élément le plus en amont de la voie JNK que nous ayons identifié est Rac1, un membre la famille des Rho-GTPase. Comme les autres petites protéines G, elle cycle entre deux états : une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. L'activation des membres de la famille des Rho-GTPase est régulée par trois classes de protéines : (1) les GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui favorisent leur activation en régulant l'échange du GDP en GTP, (2) les GAP (GTPases activating Protein) qui favorisent le retour à l'état inactif en permettant la conversion de la forme liée au GTP à celle liée au GDP et (3) les Rho-GDI (Guanosine nucleotide dissociation inhibitors) qui, en séquestrant les Rho-GTPase, empêchent ainsi les interactions avec les régulateurs et les effecteurs [432]. La drosophile contient 20 GEF différentes [433] dont certaines ont été mises en évidence pour induire l'activation de Rac1 dans différents processus morphologiques. C'est le cas de Myoblast city [434], Ced-12 [434], Trio [435] et Vav [436] dont j'ai testé l'implication dans notre modèle.



**Figure 62 : Msn appartient à une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie JNK.**

(A-B) Détection de l'expression du gène rapporteur *msn-lacZ* par un marquage X-gal dans des disques imaginaux d'aile de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn-lacZ/+* (A) et *UAS-bsk<sup>DN</sup>; vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; msn-lacZ/+* (B). (C-E) Immunomarquage de la forme phosphorylée de JNK dans des disques imaginaux d'aile de génotype *vg-GAL4 /+* (C), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (D) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-msn-ARNi/+* (E).

Afin de déterminer si ces GEF peuvent favoriser l'activation de la voie JNK dans notre modèle, l'effet de leur déplétion a été testé sur l'expression du gène rapporteur *dilp8::EGFP*. Les différents mutants ou ARNi testés pour ces différents GEF ne modulent pas l'expression de *dilp8*, à l'exception de la déplétion de Ced-12 qui diminue significativement l'expression de *dilp8* (Tableau 9 et Figure 63A,B,C). Ced-12 pourrait donc favoriser l'activation de la voie JNK en permettant l'activation de Rac1.

Nous avons contrôlé que la déplétion de Ced-12 n'affectait pas l'apoptose car cette diminution de l'expression de *dilp8* pourrait être une conséquence d'une diminution du stress du RE. Le niveau d'apoptose ne semble pas diminuer (Figure 64) ce qui infirme cette hypothèse et suggère que Ced12 pourrait bien moduler l'activation de la voie JNK. Ce résultat prometteur, mais préliminaire, reste à confirmer. Il est à noter qu'aucun site consensus putatif de fixation d'ATF4 (5'-RTTRCRTC-3') ne semble présent dans la région promotrice de *ced-12*. De plus, d'autres GEF tels que Pebble, RhoGEF2, TIAM1 sont connus pour activer Rac1 [437, 438] en amont de la voie JNK. Leur implication devrait également être testée.

En conclusion, à l'instar de l'activation de l'apoptose, le lien reliant ATF4 à l'activation de la voie JNK reste à découvrir.

#### **2.2.5.2. La voie de l'acide rétinoïque**

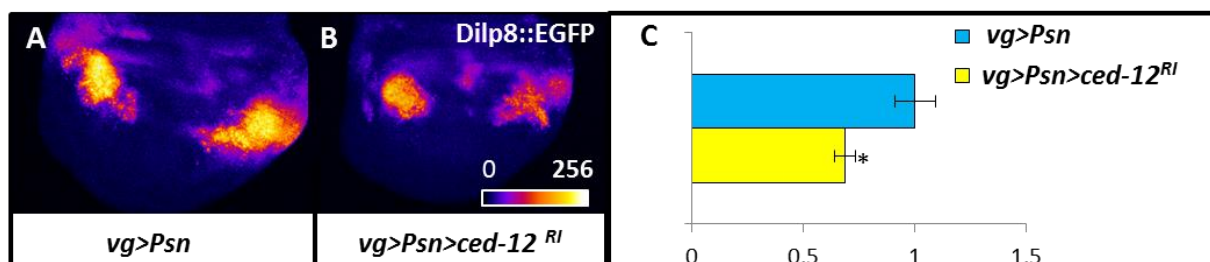
Nous avons mis en évidence que l'expression de *dilp8* par les cellules apoptotiques du disque imaginal induit un retard de l'entrée en métamorphose. Cependant, la réduction supposée de 99,4% de son niveau ARNm par le mutant *dilp8<sup>MI00727</sup>* à l'état homozygote [368] est insuffisante pour supprimer complètement le délai d'entrée en métamorphose [389]. Ce résultat suggère qu'il pourrait exister des voies de régulation de l'entrée en pupaison indépendantes de Dilp8. A ce jour, la seule autre voie décrite dans ce processus est celle de l'acide rétinoïque [369]. Elle est constituée d'un récepteur nommé Santa maria qui permet l'entrée du  $\beta$ -carotène à l'intérieur de la cellule. Le  $\beta$ -carotène internalisé est clivé par NinaB en deux molécules de rétinaldéhyde qui est transformé par l'action de déshydrogénases successives en acide rétinoïque [369].



Gènes	mutants/ARNi	n	p	effet sur l'expression relative de <i>dilp8</i>
<i>vav</i>	Vav <sup>KG02022</sup>	7	25%	pas d'effet
	Vav <sup>G0147</sup>	4	19%	pas d'effet
<i>myoblast city</i>	P{TRiP.HMS00346}attP2	9	49%	pas d'effet
<i>trio</i>	P{TRiP.JF02815}attP2	9	71%	pas d'effet
<i>ced-12</i>	P{TRiP.HM05042}attP2	10	<10 <sup>-3</sup>	suppresseur

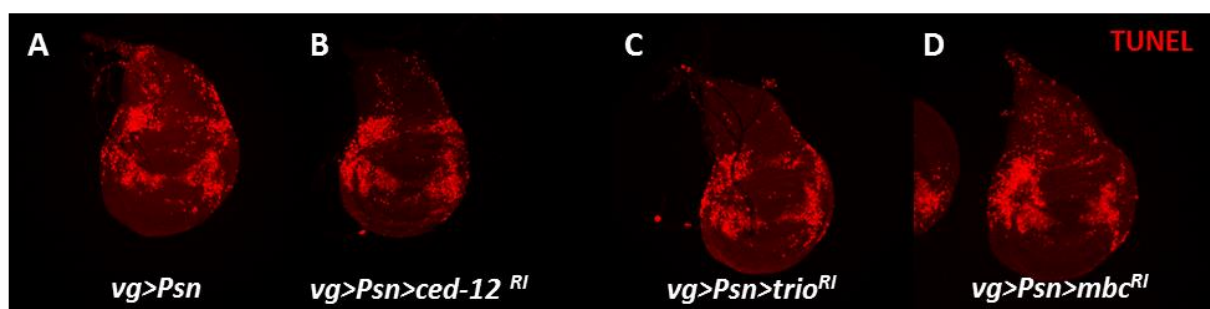
**Tableau 9 : La GEF ced-12 pourrait être impliquée dans l'induction de *dilp8*.**

Effet de la déplétion ou de mutants hétérozygotes sur l'expression relative de *dilp8* en quantifiant le marquage GFP résultant du gène rapporteur *dilp8*<sup>M100727</sup> (n=nombre minimal de disques. Test statistique=ANOVA).



**Figure 63 : Ced-12 régule l'expression de *dilp8*.**

(A,B) Intensité de détection de la GFP dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*<sup>M100727</sup>/*+* (A) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+; dilp8*<sup>M100727</sup>/*UAS-ced-12-ARNi* (B). (C) Quantification de l'expression relative de *dilp8::GFP*. Les barres d'erreurs représentent l'écart standard à la moyenne d'au moins 10 expériences indépendantes. (ANOVA, p=91%). L'astérisque indique une différence significative avec le contrôle (ANOVA, p<10<sup>-3</sup>, n=10).



**Figure 64 : Ced-12 ne module pas l'apoptose.**

(A-D) Détection des cellules apoptotiques par un marquage TUNEL dans des disques imaginaux d'aile de larves de troisième stade larvaire de génotype *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+* (A), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-ced-12-ARNi/+* (B), *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-trio-ARNi* (C) et *vg-GAL4, UAS-Psn, UAS-Psn/+ ; UAS-mbc-ARNi/+* (D).

Nous avons donc testé l'implication de la voie de biosynthèse de l'acide rétinoïque dans notre modèle. La force des phénotypes d'échancrures étant corrélée au temps de développement, nous avons étudié l'effet de la déplétion par ARNi de composants de cette voie ou de l'hétérozygotie pour des mutations perte de fonction des gènes les codant sur la répartition de ces phénotypes (Tableau 10). Aucune modification significative n'a été observée. Ces résultats suggèrent que la voie de l'acide rétinoïque n'est pas la voie additionnelle prédite de régulation de l'entrée en pupaison.



Gènes	Mutants/ARNi	n	p	Effets
<i>santa-maria</i>	<i>P{TRIP.JF03227}attP2</i>	262	90%	pas d'effet
	<i>P{TRIP.HMS01405}attP2</i>	502	71%	pas d'effet
	<i>santa maria</i> <sup>1</sup>	674	82%	pas d'effet
<i>ninaB</i>	<i>P{TRIP.HMS01404}attP2</i>	200	55%	pas d'effet
<i>Aldh</i>	<i>P{TRIP.HMS01399}attP2</i>	471	37%	pas d'effet
	<i>Aldh</i> <sup>KG02748</sup>	406	43%	pas d'effet

**Tableau 10 : La voie de l'acide rétinoïque ne semble pas impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire après induction d'une apoptose dépendante du stress du RE.**

La déplétion des membres de la voie de l'acide rétinoïque ne module pas les phénotypes d'échancrures induits par la surexpression de *Psn*. (n= nombre minimal d'ailes, ANOVA réalisé sur au moins trois expériences indépendantes).



## **I. Introduction**

## **II. Résultats**

## **III. Discussion**

## **IV. Matériels et méthodes**

## **V. Références bibliographiques**



## **1. La surexpression de *Psn* a un effet indépendant de l'activité $\gamma$ -sécrétase.**

Afin d'induire un stress chronique du RE, nous avons surexprimé, dans le domaine d'expression de *vg*, le gène codant la protéine transmembranaire Préséniline qui est connue pour son activité enzymatique dans le complexe  $\gamma$ -sécrétase, et en particulier pour la maturation de Notch. Il a été rapporté que la surexpression de *Psn* dans les cellules différenciées du disque imaginal d'œil conduit à l'apoptose de ces cellules en inhibant la signalisation Notch [8]. Cette inhibition serait due à un effet dominant négatif sur la formation de complexe  $\gamma$ -sécrétase et donc sur l'activation de Notch [8]. Si la surexpression de *Psn* dans les cellules du disque imaginal d'aile a également un effet dominant négatif, les phénotypes de surexpressions de *Psn* devraient être comparables à ceux de la perte de fonction de *Psn* ; à savoir, des phénotypes d'échancrure dus à une diminution de la signalisation Notch, caractérisée par une réduction de l'expression des cibles transcriptionnelles *cut* et *wg* [439-441]. Nous avons observé un phénotype d'échancrures suite à la surexpression de *Psn* dans le domaine *vg*. Cependant, contrairement à ce qui a été décrit dans le disque imaginal d'œil, ce phénotype n'est pas dû à un effet dominant négatif. En effet, les phénotypes causés par la déplétion de Notch sont différents de ceux induits par la surexpression de *Psn*. La déplétion de Notch n'induit pas d'apoptose, ni de stress du RE au niveau des disques de troisième stade larvaire, contrairement à la surexpression de *Psn*. De plus, nous n'avons mis en évidence aucune interaction génétique entre Notch et la voie JNK. Par ailleurs, l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* affecte des régions du disque dans lesquelles Notch n'est pas activée. Finalement, cette apoptose semble indépendante de l'activité  $\gamma$ -sécrétase. En effet, les phénotypes d'échancrure induits par la surexpression de *Psn* ne sont pas modifiés dans un fond génétique présentant un allèle de *Psn* ne contenant pas les sites catalytiques alors qu'ils le sont en présence d'un allèle qui supprime les domaines transmembranaires de *Psn*.

Nos résultats sont en accord avec une étude réalisée chez la drosophile qui soutient que la forme entière de la préséniline pourrait induire de l'apoptose indépendamment de son activité  $\gamma$ -sécrétase dans le cas où Aph-1, un membre du complexe  $\gamma$ -sécrétase, serait déficient [442]. L'apoptose induite par la surexpression de *Psn* pourrait donc être expliquée par une quantité insuffisante d'Aph-1 pour titrer la forme entière de la préséniline.

La forme holoprotéique de la préséniline est connue pour son implication dans le maintien de l'homéostasie calcique indépendamment de son activité  $\gamma$ -sécrétase au niveau du RE. Elle

joue un rôle de canal de fuite des ions calciques [127-129] et de modulateur de l'activité des canaux calciques SERCA [138], RyR [139-141] et PI3R [142, 143] chez les mammifères.

Chez la drosophile, *Psn* pourrait également moduler l'homéostasie calcique en interagissant physiquement avec la calmoduline [443], qui est un senseur du calcium cytosolique. Tout comme *Psn*, la calmoduline est capable d'interagir avec les canaux calciques, tels RyR, et de moduler leur ouverture. Ainsi, l'expression de *Psn* dans des neurones cholinergiques conduit à une modification de l'homéostasie calcique qui est inhibée par la perte de fonction de la calmoduline. Il est intéressant de noter que les phénotypes d'échancrure induits par l'expression du transgène *UAS-Psn* sous le contrôle du pilote *cut-GAL4* dans le disque imaginal d'aile sont également inhibés par une perte de fonction de la calmoduline [443]. Ces données suggèrent que le stress du RE décrit dans notre modèle pourrait être dû à une modification de l'homéostasie calcique médiée par la forme entière de la préséniline [443] lorsque celle-ci n'est plus titrée par Aph-1.

## **2. La branche PERK/ATF4 activée par la surexpression de *Psn* induit de l'apoptose.**

Nous avons mis en évidence qu'un stress chronique du RE dû à la surexpression de *Psn* déclenche l'apoptose via l'activation de la branche PERK/ATF4 de l'UPR. Dans notre modèle, la branche IRE1 est activée mais elle n'est pas impliquée dans l'exécution de l'apoptose. Elle ne semble pas non plus avoir d'effet protecteur comme cela a pu être décrit [223, 444]. En effet, l'activation de la branche IRE1/XBP1 de l'UPR par un stress modéré du RE, induit par l'inhibiteur de la glycosylation protéique, la tunicamycine, peut avoir un effet protecteur contre l'hypoxie et l'ischémie mais également contre le développement de la maladie de Parkinson dans des modèles murins et chez la drosophile [444]. Cette protection serait due à une augmentation de l'autophagie [444]. ATF6, dont le rôle dans l'UPR chez la drosophile n'a jamais été démontré, ne semble pas impliqué dans notre système.

Nous avons également mis en évidence que les voies de signalisation pro-apoptotique classiquement activées par les différentes branches de l'UPR chez les mammifères ne semblent pas l'être chez la drosophile. Chez les mammifères, la branche IRE1 déclenche l'apoptose en activant la voie JNK lors d'un stress prolongé du RE. IRE1 permet le recrutement de TRAF2,

indépendamment de l'épissage d'XBP1, via son domaine kinase [220]. TRAF2 favorise alors l'activation de la MAP3K ASK1 située en amont de la voie JNK [151]. Or nous avons mis en évidence que ni la protéine adaptatrice TRAF2, ni la MAP3K ASK1, ni la voie JNK ne sont impliquées dans la réalisation de l'apoptose dans notre modèle. La voie pro-apoptotique IRE1-TRAF2-ASK1-JNK des mammifères, si elle existe chez la drosophile, n'est donc pas activée dans notre modèle.

L'absence d'implication de la voie JNK dans l'induction de l'apoptose exclut une implication de la voie CDK5-JNK, qui médie la mort dépendante d'un stress du RE dans un modèle d'étude de la rétinite pigmentaire autosomale dominante chez la drosophile [223], dans notre système. Ceci est confirmé par l'absence d'effet de la déplétion de CDK5 sur l'apoptose et les phénotypes d'échancrure dus à la surexpression de Psn.

Chez les mammifères, les trois branches de l'UPR peuvent induire l'apoptose *via* l'activation de la voie mitochondriale, en inhibant l'expression de *bcl-2* et en favorisant celle des gènes codant les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 *bim*, *puma* et *bax* [214]. Nos résultats suggèrent que les deux seuls membres de la famille Bcl-2 connus chez la drosophile, Debcl et Buffy, ne modulent ni l'apoptose, ni l'activation de la voie JNK dans notre système.

Une troisième voie qui est classiquement décrite dans la régulation de l'apoptose en réponse à un stress chronique du RE est la voie PDI-IP3R-CAMKII [216-219]. Elle ne semble pas non plus impliquée dans notre système. En conclusion, nous avons mis en évidence que, si les voies de signalisation décrites chez les mammifères pour induire une apoptose en réponse à un stress du RE sont conservées chez la drosophile, elles ne semblent pas impliquées dans notre système.

La branche PERK/ATF4 activerait en fait l'apoptose, au moins, en diminuant la quantité de transcrits de *diap1*. La protéine DIAP1 ayant une demi-vie courte [59], la répression, même partielle, de *diap1* par la branche PERK/ATF4 pourrait être suffisante pour conduire à une disparition de DIAP1 dans les cellules stressées. La quantité de DIAP1 pourrait également être diminuée par les protéines RHG qui favorisent la dégradation de DIAP1 en activant son auto-ubiquitylation lors du processus apoptotique [45]. En effet, les gènes *rpr* et *hid* sont exprimés dans notre système. Cependant, ils le sont en réponse à l'activation de la voie JNK qui ne semble pas impliquée dans l'induction de l'apoptose. Il est donc fort probable que ce mécanisme de régulation post-traductionnelle de DIAP1 ne soit pas requis dans notre système.

Il existe d'autres mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de la quantité de DIAP1 qui pourraient également être impliqués dans notre modèle. Il serait donc intéressant de les tester. Par exemple, la quantité de DIAP1 peut être diminuée par une déstabilisation de son messenger suite à la fixation de HOW au niveau de deux sites de liaisons présents dans la région 3'UTR du transcrit de *diap1* [63]. L'activité de HOW est augmentée par son homodimérisation, *via* des phosphorylations médiées par la voie MAPK ERK [445]. Cette dernière ne semble pas moduler les phénotypes d'échancrures dans notre système, suggérant que dans le cas d'une contribution de HOW à la régulation de la quantité de DIAP1 dans notre système, son activité ne dépendrait probablement pas de la voie ERK.

Nous ne pouvons également pas exclure une contribution de l'ARN *hsw* (heat shock RNA omega), un autre régulateur post-transcriptionnel de DIAP1. Le gène *hsw*, qui est fortement exprimé en réponse à un choc thermique chez la drosophile [446], code six transcrits qui ne sont pas traduits. Les ARN *hsw* interagissent entre autre avec Hrb57A qui est une protéine qui se lie normalement avec les ARNm naissant [447]. Lors d'un processus apoptotique, l'ARNm *hsw* favorise l'interaction de Hrb57A avec la protéine DIAP1 promouvant sa dégradation et l'activation des caspases [448] par un mécanisme inconnu. De plus, les transcrits *hsw* promeuvent la formation des agrégats protéiques associés à différents modèles drosophile de maladies neurodégénératives à polyglutamine [449]. Etant donné que la surexpression de la préséniline induit la formation d'agrégats protéiques en réponse à l'activation de la branche PERK/ATF4, les transcrits de *hsw* pourraient jouer un rôle central dans notre système.

Nous avons montré que la répression de *diap1* par la branche PERK/ATF4 en réponse au stress du RE conduit à l'activation des caspases et notamment de la caspase initiateur Dronc. Dans les cellules mort-vivantes, la dégradation de DIAP1 ou l'activation de Dronc ont des conséquences indépendantes de l'activation de l'apoptose, telles que la sécrétion de signaux mitogènes *via* l'activation de la voie JNK [339, 344]. En effet, TRAF1 peut être adressée au protéasome suite à sa polyubiquitinylation par DIAP1 [450]. Dans notre modèle d'étude, nous avons mis en évidence d'une part que TRAF1 n'était pas requise pour activer la voie JNK, et d'autre part que le couple DIAP1/Dronc ne semble pas jouer un rôle fondamental dans l'activation de la voie JNK.



### **3. L'activation de la voie PERK/ATF4 n'entraîne pas de prolifération compensatoire.**

D'après nos résultats, l'apoptose dépendante d'un stress chronique du RE induit par une surexpression de *Psn* ne semble pas déclencher de prolifération compensatoire. En effet, la surexpression de *Psn* dans différents domaines du disque imaginal d'aile, tels que les domaines d'expression de *vestigial*, *nubbin*, *bithorax* et *engrailed*, ne provoque pas d'augmentation du nombre de cellules en mitose ni à proximité des cellules apoptotiques ni dans les compartiments adjacents. Au contraire, l'induction de l'apoptose dans le domaine d'expression de *vg* et de *nubbin* induit une diminution du nombre de cellules en mitose dans ces compartiments.

Il est étonnant qu'aucune augmentation de la prolifération n'ait été observée. En effet, l'apoptose dépendante de la synthèse de facteurs pro-apoptotiques tels que Rpr, Hid ou Eiger induit une augmentation de la prolifération des cellules situées à proximité de la zone endommagée [349, 352] ou dans la totalité du disque [351] qui dépend de la voie JNK. L'absence de prolifération compensatoire dans notre modèle pourrait s'expliquer par l'absence d'activation de la voie JNK dans les cellules voisines de la zone endommagée. En effet, l'activation de la prolifération compensatoire serait dépendante de la voie JNK dans ces cellules [352]. L'apoptose induite par la surexpression de *Psn* ne semble donc pas promouvoir les mêmes mécanismes que ceux induits par l'apoptose dépendante de Hid, Rpr ou Eiger.

Dans les cellules voisines des cellules apoptotiques, la voie JNK pourrait favoriser l'augmentation du taux de prolifération par l'activation de Yki [350, 353]. En effet, une relocalisation de Yki au noyau est observée dans les cellules voisines à celles où l'apoptose est induite par une activation de la voie Eiger/Wengen [451], de la dégradation de DIAP1 par l'expression de *rpr* [350], ou de l'activation de la voie mitochondriale par l'expression de *debcl* [451]. Cette translocation de Yki au noyau se traduit par une activation de ses cibles transcriptionnelles tels qu'*expanded* [451]. Le fait que l'apoptose dépendante d'un stress du RE n'induit pas de relocalisation de Yki, ni d'activation de ses cibles est donc en accord avec le fait qu'aucune augmentation de la prolifération ne soit observée dans notre modèle.

Afin de déterminer si l'apoptose dépendante d'un stress du RE peut être compensée par une augmentation de la prolifération, une dernière approche a été utilisée. Différents modèles

d'étude mettent en évidence que l'augmentation du taux de prolifération est la résultante de l'expression de morphogènes. En effet, l'activation de la prolifération compensatoire dépendrait également de l'expression de *wg* dans les cellules saines situées en bordure des cellules mourantes lorsqu'*eiger* est exprimé dans la poche du disque d'aile [349, 350]. Or, la surexpression de *Psn* n'induit pas d'expression ectopique de *wg* ce qui renforce nos conclusions précédentes. Cependant, des études récentes montrent que *wg* ne serait ni exprimé, ni nécessaire pour induire une augmentation du taux de prolifération en absence d'ablation d'une partie du tissu [348, 351]. En effet, l'apoptose induite par *Eiger* provoque une ablation de la poche du disque [349, 350] qui n'est pas reproduite lorsque la mort est induite par l'expression de *hid* dans le même domaine [351]. L'augmentation du taux de prolifération, observée suite à une apoptose dépendante de *Hid*, est indépendante de *Wg* mais également de *Dpp* [351] qui est le second morphogène ayant un rôle putatif dans l'induction de la prolifération compensatoire. Bien que l'expression de *wg* favorise la régénération d'un tissu, elle semble être requise spécifiquement en cas d'ablation d'une région telle que la poche du disque et ne semble pas être une caractéristique de la prolifération compensatoire. Il n'est également pas à exclure qu'*Eiger* puisse réguler des voies de signalisation différentes de celle de *Hid*. D'après ces études récentes, il semble donc normal de ne pas détecter d'expression ectopique de *Wg* ou d'autres mitogènes dans notre modèle puisque la mort dépendante de la surexpression de *Psn* n'induit pas d'ablation de tissu quel que soit le domaine d'expression.

Ces différents résultats sont tous en accord avec le fait que l'apoptose dépendante d'un stress du RE ne promeut pas de prolifération compensatoire afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

#### **4. L'activation de la voie JNK permet la coordination de la croissance des compartiments du disque imaginal d'aile.**

Si la surexpression de *Psn* peut conduire à la mort des cellules l'exprimant, elle peut également modifier le comportement des cellules voisines. En effet, nous avons mis en évidence que l'apoptose induite par la surexpression de *Psn* dans le compartiment postérieur du disque imaginal d'aile promeut un arrêt de la prolifération cellulaire dans le compartiment antérieur qui est corrélé à la quantité de cellules apoptotiques.

Différents modèles de la régulation de la prolifération du disque d'aile proposent que les pressions et tensions entre cellules peuvent moduler la prolifération [452-454]. Une diminution du nombre de cellules dans un compartiment entier du disque, par exemple par l'apoptose des cellules surexprimant *Psn* dans le compartiment postérieur, pourrait modifier ces pressions et tensions et avoir un effet sur la prolifération et la croissance des cellules du compartiment voisin. Les cellules du disque imaginal d'aile formant un épithélium monocouche adhérant à une matrice extracellulaire, les forces physiques seraient transmises entre les cellules par leur site d'adhésion [455] et donc par les cadhérines et intégrines, deux familles de protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire.

La voie JNK favorise l'augmentation de la taille des cellules du compartiment endommagé et contrôle également le maintien de la taille des cellules du compartiment adjacent. La voie JNK semble donc réguler la taille de toutes les cellules de l'aile. Une hypothèse parcimonieuse permettant d'expliquer cette propriété serait qu'elle régulerait l'émission d'un signal affectant l'ensemble des cellules du disque d'aile. Nous avons testé deux candidats, Wg et Dpp, qui sont les principaux morphogènes impliqués dans le développement du disque d'aile. L'expression de *dpp* n'est pas modulée par l'expression de *Psn* dans le domaine *en*, tandis que la déplétion de Wg dans le domaine d'induction ne modifie pas la taille des cellules des différents compartiments (données non montrées). Le signal recherché ne semble donc pas être Wg ou Dpp. Ce signal pourrait être Dilp8. En effet, les phénotypes d'échancrure et la tailles des cellules de l'aile sont corrélés à l'induction d'un retard du temps de développement. Il est donc envisageable que les signaux qui favorisent l'arrêt de la prolifération dans le compartiment adjacent soit les mêmes que ceux qui induisent le retard de l'entrée en métamorphose. Cette hypothèse est renforcée par le fait que Dilp8 est impliquée dans la symétrie de taille entre les ailes d'un même individu. En effet, en l'absence de Dilp8, les ailes d'un même individu présentent une dissymétrie [368]. Dilp8 pourrait donc jouer un rôle équivalent au sein d'un même disque. La symétrie entre les deux ailes d'un individu est également régulée par la cycline G qui est une cycline non conventionnelle [456]. Il serait donc intéressant de tester le rôle de Dilp8 et de la cycline G dans la régulation de la coordination de la croissance entre compartiments d'un même disque imaginal d'aile.

## **5. La branche PERK/ATF4 active la voie JNK qui régule l'expression de *dilp8*.**

Nous avons mis en évidence que l'activation de la branche PERK/ATF4 de l'UPR par la surexpression de *Psn* induit un retard d'entrée en métamorphose en parallèle de l'apoptose. Elle favorise ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire indépendamment d'une augmentation du taux de prolifération. Ce retard est dû à l'expression de *dilp8* en réponse à l'activation de la voie JNK par la branche PERK/ATF4.

La coordination entre les différentes kinases de cette voie de signalisation contribuant à la spécificité de réponse [86], nous avons identifié les composants de la voie JNK impliqués dans la régulation de l'expression de *dilp8* et du retard de l'entrée en métamorphose. Une voie Rac1/Slpr/Mkk4/Hep/Bsk/Jra/Fra a été identifiée. Elle diffère de la voie JNK impliquée dans la régulation de l'apoptose qui dépend essentiellement des MAP3K d'ASK1 et TAK1 en réponse de l'activation de protéines adaptatrices telles que TRAF1, TRAF2 ou Tab2 [71, 74, 85, 88, 450]. Aucun composant de cette voie pro-apoptotique n'est impliqué dans notre système. La combinaison que nous avons mise en évidence est retrouvée dans un processus non apoptotique : la fermeture dorsale de l'embryon. En effet, une voie Rac1/Slpr/Mkk4/Hep/Bsk/Jra/Fra favorise le rapprochement et la fusion des deux épithéliums épidermiques de l'embryon. Dans ce système, l'activation de la MAP3K Slpr [314, 315] dépend également de Msn [315]. Cette MAP4K semble jouer un rôle opposé dans notre modèle car elle inhiberait la phosphorylation de Bsk. Le rôle que nous avons observé est en accord avec une étude de phosphoprotéomique dans laquelle Msn inhibe la phosphorylation de Bsk [457]. L'expression de *msn* étant dépendante de la voie JNK dans notre modèle, il est tentant de penser que Msn serait impliquée dans un rétrocontrôle négatif de cette voie. Nous n'avons pas mis en évidence son niveau d'action.

Il serait intéressant de déterminer si l'activation de la voie Rac1/Slpr/JNK par la branche PERK/ATF4 est généralisable à (1) tous les disques imaginaux en prolifération, (2) à tous les types de stress du RE et (3) à d'autres conditions conduisant à une expression de *dilp8*, telles que des disques imaginaux présentant un défaut de croissance [375]. Dans ce dernier modèle, Il semblerait que la voie JNK soit dépendante de l'activation de TAK1 et de TRAF2 (Colombani *et al.*, EDRC 2013). Cette combinaison différerait donc de celle que nous avons

mise en évidence, suggérant que la combinaison des différentes kinases ne serait pas seulement dépendante de la fonction de la voie JNK mais également du stimulus l'activant.

Des données récentes obtenues sur un modèle d'étude de régénération en absence de prolifération compensatoire chez la drosophile suggèrent que la voie JAK/STAT pourrait réguler l'expression de *dilp8*, et ce en aval de l'activation de la voie JNK (La Fortezza *et al.*, EDRC 2013). Il serait donc intéressant d'une part de connaître la combinaison de cette voie JNK, et d'autre part de tester si la voie JAK/STAT est activée dans notre système et quelle serait son implication dans l'expression de *dilp8*. Des expériences préliminaires montrent que la déplétion, en utilisant différents RNAi dont l'efficacité a été démontrée (communication personnelle d'Antoine Borensztein, CGM), d'Unpaired, l'un des trois ligands de la voie JAK/STAT, n'a aucun effet sur la répartition des phénotypes d'échancrure (données non montrées).

## **6. L'activation de la voie JNK permet le maintien de l'homéostasie tissulaire en induisant un délai de l'entrée en métamorphose.**

L'inhibition de l'activation de la voie JNK par la déplétion de la MAP3K Slpr ou l'expression du gène codant la phosphatase Puc supprime le retard de développement induit par la surexpression de *Psn* dans le disque imaginal d'aile. Ce résultat est en accord avec ceux décrivant que la voie JNK régulerait l'ensemble des mécanismes qui favorisent le délai de l'entrée en métamorphose suite à un défaut de croissance d'un disque imaginal [375]. Cependant, l'homozygotie pour l'allèle mutant *dilp8*<sup>MI00727</sup>, qui déplete de 99,4% les transcrits de *dilp8* [368], n'est pas suffisante pour supprimer totalement le retard de développement induit par la surexpression de *Psn*. Nos résultats suggèrent donc l'existence de voies additionnelles dépendantes de l'activation de la voie JNK qui régulent l'entrée en métamorphose. La voie de l'acide rétinoïque a été rapportée comme pouvant moduler le temps de développement larvaire [349]. Nos données suggèrent que cette voie n'est pas impliquée dans le contrôle de l'entrée en métamorphose dans notre système. Cependant, nous n'avons pas testé si la déplétion des membres de la voie des rétinoïdes chez des homozygotes pour l'allèle *dilp8*<sup>MI00727</sup> peut inhiber complètement le retard de développement. Une telle

expérience a été réalisée dans le cas d'une croissance aberrante du disque imaginal d'aile, mais le retard de développement n'a pas été complètement supprimé, suggérant l'existence d'une signalisation additionnelle [368].

L'orthologue de drosophile de p53 a également été décrite comme régulant l'entrée en métamorphose [370]. Ses liens avec la voie JNK et les autres voies régulant le temps de développement n'ont pas été rapportés. Des expériences préliminaires nous ont appris qu'un fond génétique présentant un allèle hétérozygote perte de fonction de p53 provoque un décalage des phénotypes d'échancrures dépendant de la surexpression de *Psn* vers les phénotypes les plus forts. D'après ces résultats et d'après son rôle décrit dans la littérature, p53 pourrait donc favoriser l'homéostasie tissulaire en favorisant l'activation de la voie JNK. Cependant, nous n'avons pas déterminé si le délai de développement induit par la surexpression de *Psn* était modifié dans ce contexte génétique et si p53 est en amont de la voie JNK dans notre modèle. Il serait également intéressant de combiner cette perte de fonction à un fond génétique homozygote pour l'allèle *dilp8*<sup>M10072</sup>, ce qui nous permettrait de déterminer si son implication est dépendante de *dilp8*.

## **I. Introduction**

## **II. Résultats**

## **III. Discussion**

## **IV. Matériels et méthodes**

## **V. Références bibliographiques**





## 1. Stocks et croisements

Les mouches ont été élevées sur un milieu standard composé d'agar et de maïs. Tous les croisements ont été réalisés à 25°C sauf indication contraire. Les lignées utilisées sont les lignées, *UAS-puc* [316], *UAS-Psn* (Psn+14) [458], *UAS-Psn-myc* [122], *UAS-EGFP9.2* [459], *UAS-Notch<sup>NICD</sup>* [460], *UAS-hep<sup>CA</sup>* [383], *UAS-eiger* [47], *sd<sup>11L</sup>* et *sd<sup>3L</sup>* [461], *msn<sup>06946</sup>* (Bl#11707), les mutants du gène codant DIAP1 *Thread<sup>5</sup>* [462], *Thread<sup>6B</sup>* [416] et *thread<sup>i5C8</sup>* (Bl#12093) [50], *UAS-bsk<sup>DN</sup>* (Bl#108773) [463], *Psn<sup>I2</sup>* (Bl#5463), *Psn<sup>227</sup>* (Bl#8303), *Pdi<sup>EY08113</sup>* (Bl#19868), *Itp-r83A<sup>90B.0</sup>* (Bl#30737), *Itp-r83A<sup>MB03611</sup>* (Bl#30737), *UAS-CaMKII.R3* (Bl#29662), *UAS-hsc70-3<sup>DN</sup>* (Bl#5842), *Vav<sup>KG02022</sup>* (Bl#14176), *Vav<sup>GD147</sup>* (Bl#11837), *santa-maria<sup>1</sup>* (Bl#24520), *Aldh<sup>KG02748</sup>* (Bl#12900), *Df(3L)H99* (Bl#9926), *Mpk2<sup>1</sup>* (Bl#8822), *p38<sup>KG01337</sup>* (Bl#14364), *dpp<sup>d12</sup>* (Bl#2070), *dpp<sup>KG08191</sup>* (Bl#14694), *dpp<sup>10638</sup>* (Bl#12379), *debcl<sup>E26</sup>* (Bl#27342), *debcl<sup>W105</sup>* (Bl#27341), *buffy<sup>H37</sup>* (Bl#27340), *debcl<sup>E26</sup>buffy<sup>H37</sup>* (Bl#27338), *debcl<sup>W105</sup>buffy<sup>H37</sup>* (Bl#27339) proviennent du Bloomington *Drosophila* Stock Center et de dons.

Les rapporteurs *dpp-lacZ BS3.0* (BL#5527), *en-lacZ* (BL#5801), *hid-lacZ* (hidPZ05014, BL#11642), *wg-lacZ* (BL#11205), *puc<sup>E69</sup>* [464], *UAS-xbp1::EGFP* [394], *rpr-LacZ* (*rpr-11lacZ*; [81]), *rpr-lacZ<sup>XRE</sup>* [412], *hh-lacZ* (Bl#5530), *ptc-lacZ* (Bl#10514), *dad-lacZ<sup>11E4</sup>* (Bl#10304), *PCNA::GFP* (Bl# 25749), *dilp8<sup>M100727</sup>* (Bl#33079), *diap1::lacZ* [465], *cycline E-lacZ* (Bl#102231), *ex-lacZ* (Bl#44248) et les pilotes *GMR-Gal4* (BL#9146), *en-Gal4* (BL#30564), *nub-GAL4* (don de Anne-Marie Martinez), *bx-GAL4* (Bl#8860), *vg-GAL4* [466] proviennent également du Bloomington *Drosophila* Stock Center et de dons.

Les lignées ARNi *UAS-atf4-ARNi* (Bl#25985), *UAS-Rac1-ARNi* (Bl#28985), *UAS-atf6-ARNi* (Bl#26211), *UAS-Pdi-ARNi* (Bl#28039), *UAS-Itp-r83A-ARNi* (Bl#25937), *UAS-CaMKII-ARNi* (Bl#29401), *UAS-Nox-ARNi* (Bl#32433), *UAS-perk-ARNi* (ID110278), *UAS-ire1-ARNi* (Bl#36743), *UAS-ref(2)P-ARNi* (Bl#33978), *UAS-ref(2)P-ARNi* (Bl#36111), *UAS-Vav-ARNi* (Bl#39059), *UAS-mbc-ARNi* (Bl#32355), *UAS-trio-ARNi* (Bl#37732), *UAS-ced-12-ARNi* (Bl#28556), *UAS-santa-maria-ARNi* (Bl#29550), *UAS-santa-maria-ARNi* (Bl#34995), *UAS-ninaB-ARNi* (Bl#34994), *UAS-Aldh-ARNi* (Bl#34989), *UAS-Mekk1-RNAi* (Bl#28587) proviennent de la collection TRIP (Transgenic RNAi Project) disponible au Bloomington *Drosophila* Stock Center.

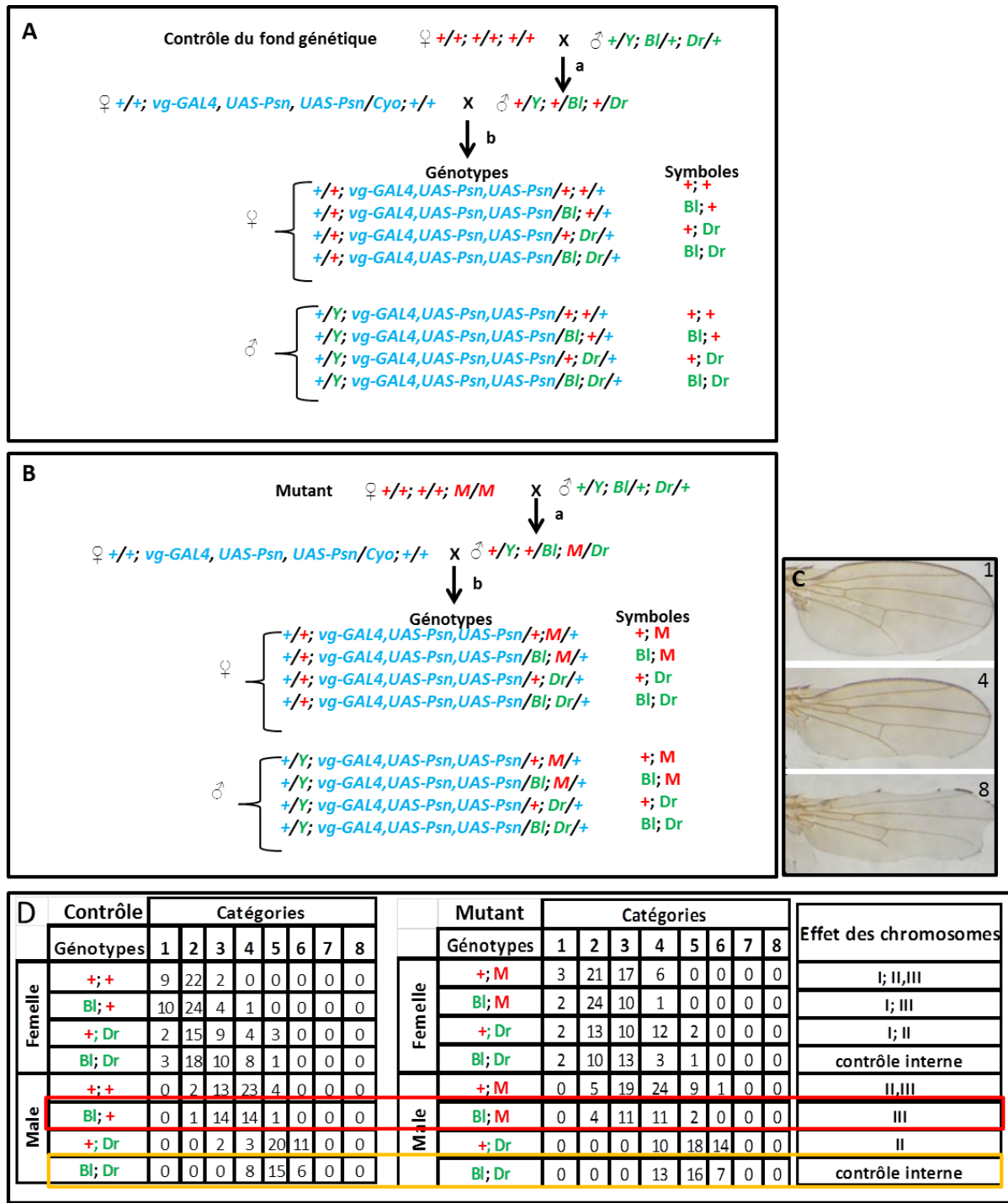
Les lignées *UAS-slpr-ARNi* (ID 106449), *UAS-msn-ARNi* (ID 101517), *UAS-Psn-ARNi* (ID 101379), *UAS-atf6-ARNi* (ID 36504), *UAS-xbp1-ARNi* (ID 102632), *UAS-Mmp1-ARNi* (ID 101505), *UAS-Mmp2-ARNi* (ID 107888), *UAS-Timp-ARNi* (ID 109427), *UAS-chickadee-ARNi* (ID 102759), *UAS-sickle-ARNi* (ID 102512), *UAS-hid-ARNi* (ID 8269), *UAS-fat-ARNi* (ID 108863), *UAS-sav-ARNi* (ID 101323), *UAS-ex-ARNi* (ID 109281), *UAS-warts-ARNi* (ID 106174), *UAS-hpo-ARNi* (ID 104169), *UAS-sd-ARNi* (ID 101497), *UAS-rolled-ARNi* (ID 109108), *UAS-rolled-ARNi* (ID 43124), *UAS-Mekk1-ARNi* (ID 25529), *UAS-Mekk1-ARNi* (ID 25528), *UAS-licorne-ARNi* (ID 106822), *UAS-licorne-ARNi* (ID 20166), *UAS-p38a-ARNi* (ID 102484), *UAS-p38b-ARNi* (ID 108099) et *UAS-p38c-ARNi* (ID 105173) ont été fournies par le Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC).

Les lignées *UAS-hep-RNAi* (4353R2) et *UAS-Notch-RNAi* (3936R) proviennent du National Institute of Genetics stock center (NIG-Fly, Japon).

Les contrôles du fond génétique sont adaptés aux différentes lignées transgéniques que nous avons utilisées. La lignée *y,w[1118];P{attP,y[+],w[3]}* (ID 60100) comme contrôle génétique des ARNi de la collection KK de VDRC, la lignée *w<sup>1118</sup>* est utilisée comme contrôle du fond génétique de la collection GD de VDRC. La lignée *y<sup>l</sup>,v<sup>l</sup>;P{UAS-GFP.VALIUM10}attP2* (Bl#35786) a été utilisée comme contrôle de la collection d'ARNi TRIPV10 et la lignée *y<sup>l</sup>,sc<sup>l</sup>,v<sup>l</sup>;P{nos-phiC31\int.NLS}X; P{CaryP}attP2* (Bl#25710) pour la collection d'ARNi TRIP V20. Les mouches Canton S ont servi de référence pour toutes les autres lignées.

## **2. Test d'interaction génétique.**

Afin de déterminer si un gène peut interagir génétiquement avec *Psn*, la modulation de la répartition des phénotypes d'échancrure induit par la surexpression de *Psn* par la mutation d'un gène donné ou par la déplétion de la protéine en résultant a été testée. Dans l'exemple représenté (Figure 65), la mutation (M) est située sur le chromosome III. Etant donné que le fond génétique entre le mutant et le contrôle du fond génétique n'est pas toujours parfaitement identique, nous avons décidé de tester l'effet de chaque chromosome de la lignée mutante afin de déterminer si l'effet observé provient du chromosome portant la mutation.



**Figure 65 : Protocole des tests d'interaction génétique.**

(A-B) Croisement type réalisé lors des tests d'interaction génétique, permettant de déterminer l'effet de chaque chromosome de la lignée mutante (B) comparé au contrôle du fond génétique (A) sur la répartition des phénotypes d'échancrure (C). (D) Exemple de répartition des phénotypes d'échancrure et détection des effets des différents chromosomes.

Pour cela, un croisement préliminaire (a) est nécessaire. Les femelles de lignées mutantes (Figure 65B) ou du contrôle (Figure 65A), présentant un fond génétique le plus proche possible, sont croisées avec des males contenant des chromosomes de référence portant les marqueurs *Bl* pour le chromosome II et *Dr* pour le chromosome III. Ces chromosomes portant les marqueurs *Bl* et *Dr* sont homogènes. La descendance male provenant de ces premiers croisements et portant les chromosomes marqués par les mutations de *bristle* (*Bl*) et de *drop* (*Dr*) est alors croisée avec des femelles *vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/CyO* lors du croisement (b). La descendance ne présentant pas le chromosome balancer *CyO* est alors séparée en fonction du sexe et en fonction des marqueurs *Bl*, *Dr*, ce qui donne huit génotypes. Les femelles permettent de déterminer l'effet du chromosome I de la lignée mutante tandis que les chromosomes de référence permettront de déterminer l'effet des chromosomes II et III. Les phénotypes d'échancrure d'ailes de ces différents génotypes sont catégorisés en fonction du nombre et de la taille des échancrures (Figure 65C). Les deux ailes de chaque mouche sont prises en compte séparément. La catégorie 1 correspond à des ailes sauvages et la catégorie 8 correspond aux phénotypes les plus forts caractérisés par une ablation de tissu dans les régions antérieure et postérieure de l'aile (Figure 65C-D). La comparaison entre les différents génotypes issus du croisement mutant et du croisement contrôle permet de déterminer l'effet des différents chromosomes (Figure 65D). Par exemple la comparaison de la répartition des phénotypes d'échancrure des males de génotype *+/Y;vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/Bl;+/+* (+;+) avec celle des males de génotype *+/Y;vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/Bl;M/+* (M;+) permet de déterminer l'effet du chromosome III de la souche mutante comparé au chromosome III du contrôle (Figure 65D, encadré en rouge). De plus, afin de pouvoir comparer ces différentes conditions des contrôles internes existent entre les différents croisements puisque dans la série I et dans la série II, on obtient des males de génotype *+/Y;vg-GAL4,UAS-Psn,UAS-Psn/Bl;Dr/+* pour lesquels les différents chromosomes ont le même fond génétique (encadré en orange). Etant donné que les forces des phénotypes diffèrent entre mâles et femelles, seuls les résultats obtenus avec les males sont représentés mais l'ensemble des données sont prises en compte dans une analyse statistique par ANOVA (Analyse of Variance). A chaque fois, un minimum de trois expériences indépendantes a été réalisé.

### **3. Immunohistochimie et microscopie.**

Les larves sont retournées et disséquées en PBS1X (Phosphate buffer saline) pour extraire un maximum de tube digestif et de corps gras. Les carcasses sont ensuite fixées en PBS1X/Formaldéhyde 3,7% pendant 20 minutes à température ambiante. Le formaldéhyde est ensuite éliminé par trois lavages successifs d'au moins cinq minutes en PBS1X/Tween 0,3% (PBT) permettant de perméabiliser les différents tissus. Les carcasses sont ensuite incubées dans une solution de saturation de PBT/BSA 2% (bovine serum albuvine) pendant une heure, puis avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation. L'incubation est réalisée sur la nuit à 4°C ou pendant deux heures à température ambiante. Les carcasses sont ensuite rincées par trois lavages successifs de 5 minutes minimum en PBT de façon à éliminer l'anticorps primaire en suspension, puis incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation pendant deux heures à température ambiante. Pour finir, elles sont rincées par trois lavages successifs en PBT. Les disques sont isolés des carcasses en PBS1X puis montées entre lame et lamelle dans du cytifluor (BioScience).

Les anticorps primaires utilisés sont : l'anti-caspase-3 de lapin (Asp175, Cell Signaling, 1:20), l'anti anti- $\beta$ -D-Galactosidase (40-1a, DSHB, Université d'Iowa, 1:200), l'anti-MMP1 de souris (5H7B11, DSHB, Université d'Iowa, 1:30), l'anti-DIAP1 de souris (don de B. Hay, 1:200), l'anti-Phospho-Histone 3 de lapin (PH3) (H3 Ser10, Millipore, 1:1000), l'anti-myc de souris (9E10, Université d'Iowa, 1:200), l'anti-Ref(2)P de lapin (D. Contamine, 1:400), l'anti-Ref(2)P de rat (D. Contamine, 1:800), l'anti-Fascicline III de souris (7G10, DSHB, Université d'Iowa, 1:50), l'anti-BrdU de souris (1:200, G3G4, DSHB, Université de l'Iowa), l'anti-Yki de lapin (don de Irvine, 1:400) et l'anti- active<sup>®</sup> JNK de lapin (Pomega V793A). Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa Fluor 488, 568 ou 647 proviennent de Molecular Probes (Eugen, OR, 1:400). Les images sont prises en utilisant un microscope confocal Leica SPE. Les images sont retravaillées et traitées en utilisant ImageJ.

Le marquage TUNEL est réalisé à l'aide du Kit ApopTag Red in situ apoptosis detection (Chemicon, Millipore) selon les recommandations du fournisseur.

#### **4. Marquage au BrdU.**

Les larves de troisième stade issues des génotypes d'intérêt sont prélevées dans le milieu de culture. Elles sont ensuite disséquées dans du milieu de culture cellulaire Schneider pour extraire un maximum de tube digestif et de corps gras. Les carcasses sont ensuite incubées dans du BrdU (1 mg/ml) dilué dans ce même milieu de culture pendant 30 minutes à température ambiante. Après un rinçage rapide dans ce même milieu, elles sont fixées dans du PBT/formaldéhyde 5% pendant 20 minutes à température ambiante, rincées trois fois 3 minutes dans du PBT, dénaturées dans une solution d'HCl pendant deux fois 15 minutes puis le HCl est neutralisé dans une solution de tétraborate de sodium (0,04 g/ml). Le BrdU est ensuite détecté par immunohistochimie. Les larves disséquées sont bloquées pendant 45 minutes à température ambiante dans une solution de PBT/BSA 2%, incubées à 4°C pendant la nuit avec un anticorps anti-BrdU produit chez la souris (DSHB) dilué au 200<sup>ème</sup> dans la solution de blocage. Les larves sont ensuite lavées trois fois 20 minutes dans du PBT/BSA 2% et incubées une heure avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la rhodamine et dilué au 50<sup>ème</sup> dans la solution de blocage. L'anticorps secondaire est lavé trois fois 20 minutes en PBT. Soit les disques d'aile sont récupérés et montés entre lame et lamelle dans du cytifluor (BioScience), soit ils subissent une seconde fixation dans du PBT/formaldéhyde 3,7% afin de réaliser un immunomarquage.

#### **5. Marquage au X-GAL (visualisation de l'expression de *lacZ*).**

Les larves sont retournées et disséquées en PBS1X (pH=7,8) pour extraire un maximum de tube digestif et de corps gras. Les larves retournées sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante sur balancelle dans une solution de fixation (PBS-glutaraldéhyde 1%), rincées trois fois rapidement et trois fois 10 minutes dans du PBS puis incubées à 37°C à l'obscurité dans une solution de X-Gal ( $5 \cdot 10^{-3}$  g/ml). Le temps d'incubation varie selon les constructions utilisées. Les larves sont ensuite rincées trois fois rapidement et trois fois 10 minutes dans du PBS. Enfin, les disques d'aile sont récupérés, montés sur lame dans du cytifluor (BioScience) et observés au microscope (DMRHC, Leica).

## **6. Quantification de l'expression de *dilp8* et de la prolifération.**

L'intensité moyenne de fluorescence de la GFP codée par le rapporteur *dilp8*<sup>MI00727</sup> est évaluée en utilisant le logiciel image J. Pour cela, le contour du disque est déterminé en utilisant l'outil « Freehand selection ». La fonction mesure permet de déterminer l'intensité moyenne dans la zone sélectionnée. Une zone du notum ne présentant pas d'expression de la GFP est sélectionnée en utilisant la même fonction. La valeur résultant de la fonction « mesure » permet de déterminer le bruit de fond qui sera retranché à la valeur initiale. Afin de pouvoir comparer deux conditions, il est nécessaire d'avoir des disques de taille similaire. Après normalisation, les différentes intensités entre les différentes conditions sont comparées par ANOVA.

Les cellules en prolifération du disque imaginal d'aile, visualisées par un marquage anti-PH3, sont quantifiées manuellement en utilisant l'outil « counter cell » sur ImageJ.





## **I. Introduction**

## **II. Résultats**

## **III. Discussion**

## **IV. Matériels et méthodes**

## **V. Références bibliographiques**



1. Ron D, Walter P: **Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(7):519-529.
2. Yoshida H: **ER stress and diseases.** *FEBS J* 2007, **274**(3):630-658.
3. Rath E, Haller D: **Inflammation and cellular stress: a mechanistic link between immune-mediated and metabolically driven pathologies.** *Eur J Nutr* 2011, **50**(4):219-233.
4. Malhi H, Kaufman RJ: **Endoplasmic reticulum stress in liver disease.** *J Hepatol* 2011, **54**(4):795-809.
5. Li H, Zhang XY, Wu TJ, Cheng W, Liu X, Jiang TT, Wen J, Li J, Ma QL, Hua ZC: **Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Rat Mandibular Cartilage Thinning under Compressive Mechanical Stress.** *J Biol Chem* 2013, **288**(25):18172-18183.
6. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L: **ER stress and neurodegenerative diseases.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(3):385-392.
7. Zhao L, Ackerman SL: **Endoplasmic reticulum stress in health and disease.** *Curr Opin Cell Biol* 2006, **18**(4):444-452.
8. Ye Y, Fortini ME: **Apoptotic activities of wild-type and Alzheimer's disease-related mutant presenilins in Drosophila melanogaster.** *J Cell Biol* 1999, **146**(6):1351-1364.
9. Levitan D, Lee J, Song L, Manning R, Wong G, Parker E, Zhang L: **PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(21):12186-12190.
10. Kim J, Kleizen B, Choy R, Thinakaran G, Sisodia SS, Schekman RW: **Biogenesis of gamma-secretase early in the secretory pathway.** *J Cell Biol* 2007, **179**(5):951-963.
11. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
12. Abdelwahid E, Yokokura T, Krieser RJ, Balasundaram S, Fowle WH, White K: **Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis.** *Dev Cell* 2007, **12**(5):793-806.
13. Vaux DL, Korsmeyer SJ: **Cell death in development.** *Cell* 1999, **96**(2):245-254.
14. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR *et al*: **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(1):3-11.
15. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: **Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1757**(9-10):1371-1387.
16. Vachon PH: **[Cell survival: differences and differentiation].** *Med Sci (Paris)* 2006, **22**(4):423-429.
17. Lohmann I, McGinnis N, Bodmer M, McGinnis W: **The Drosophila Hox gene deformed sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper.** *Cell* 2002, **110**(4):457-466.
18. Kuranaga E, Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K, Miura M: **Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in Drosophila male terminalia.** *Development* 2011, **138**(8):1493-1499.
19. Hail N, Jr., Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M: **Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys.** *Apoptosis* 2006, **11**(6):889-904.
20. Baehrecke EH: **How death shapes life during development.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(10):779-787.

21. Baehrecke EH: **Autophagy: dual roles in life and death?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(6):505-510.
22. Bergmann A, Agapite J, Steller H: **Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates.** *Oncogene* 1998, **17**(25):3215-3223.
23. Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E: **Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire.** *Mol Biol Evol* 2008, **25**(5):831-841.
24. Kumar S: **Caspase function in programmed cell death.** *Cell Death Differ* 2007, **14**(1):32-43.
25. Danial NN, Korsmeyer SJ: **Cell death: critical control points.** *Cell* 2004, **116**(2):205-219.
26. Horvitz HR: **Nobel lecture. Worms, life and death.** *Biosci Rep* 2003, **23**(5-6):239-303.
27. Hay BA, Guo M: **Caspase-dependent cell death in Drosophila.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:623-650.
28. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM: **Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1757**(9-10):1301-1311.
29. Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW: **Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax.** *Cell* 2008, **135**(6):1074-1084.
30. Chen P, Abrams JM: **Drosophila apoptosis and Bcl-2 genes: outliers fly in.** *J Cell Biol* 2000, **148**(4):625-627.
31. Colussi PA, Quinn LM, Huang DC, Coombe M, Read SH, Richardson H, Kumar S: **Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the Drosophila melanogaster cell death machinery.** *J Cell Biol* 2000, **148**(4):703-714.
32. Quinn L, Coombe M, Mills K, Daish T, Colussi P, Kumar S, Richardson H: **Buffy, a Drosophila Bcl-2 protein, has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions.** *EMBO J* 2003, **22**(14):3568-3579.
33. Kuranaga E: **Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo.** *Genes Cells* 2012, **17**(2):83-97.
34. Brachmann CB, Jassim OW, Wachsmuth BD, Cagan RL: **The Drosophila bcl-2 family member dBorg-1 functions in the apoptotic response to UV-irradiation.** *Curr Biol* 2000, **10**(9):547-550.
35. Galindo KA, Lu WJ, Park JH, Abrams JM: **The Bax/Bak ortholog in Drosophila, Debcl, exerts limited control over programmed cell death.** *Development* 2009, **136**(2):275-283.
36. Wu JN, Nguyen N, Aghazarian M, Tan Y, Sevrioukov EA, Mabuchi M, Tang W, Monserrate JP, White K, Brachmann CB: **grim promotes programmed cell death of Drosophila microchaete glial cells.** *Mech Dev* 2010, **127**(9-12):407-417.
37. Yu X, Wang L, Acehan D, Wang X, Akey CW: **Three-dimensional structure of a double apoptosome formed by the Drosophila Apaf-1 related killer.** *J Mol Biol* 2006, **355**(3):577-589.
38. Kanuka H, Sawamoto K, Inohara N, Matsuno K, Okano H, Miura M: **Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a Drosophila Apaf-1/CED-4-related caspase activator.** *Mol Cell* 1999, **4**(5):757-769.

39. Dorstyn L, Mills K, Lazebnik Y, Kumar S: **The two cytochrome c species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in Drosophila cells.** *J Cell Biol* 2004, **167**(3):405-410.
40. Zimmermann KC, Ricci JE, Droin NM, Green DR: **The role of ARK in stress-induced apoptosis in Drosophila cells.** *J Cell Biol* 2002, **156**(6):1077-1087.
41. Mendes CS, Arama E, Brown S, Scherr H, Srivastava M, Bergmann A, Steller H, Mollereau B: **Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the Drosophila retina.** *EMBO Rep* 2006, **7**(9):933-939.
42. Arama E, Bader M, Srivastava M, Bergmann A, Steller H: **The two Drosophila cytochrome C proteins can function in both respiration and caspase activation.** *EMBO J* 2006, **25**(1):232-243.
43. Thomenius M, Freel CD, Horn S, Krieser R, Abdelwahid E, Cannon R, Balasundaram S, White K, Kornbluth S: **Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate Drosophila programmed cell death.** *Cell Death Differ* 2011, **18**(10):1640-1650.
44. Sandu C, Ryoo HD, Steller H: **Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death.** *J Cell Biol* 2010, **190**(6):1039-1052.
45. Muro I, Hay BA, Clem RJ: **The Drosophila DIAP1 protein is required to prevent accumulation of a continuously generated, processed form of the apical caspase DRONC.** *J Biol Chem* 2002, **277**(51):49644-49650.
46. Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X, Abrams JM: **Dark is a Drosophila homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**(5):272-279.
47. Igaki T, Yamamoto-Goto Y, Tokushige N, Kanda H, Miura M: **Down-regulation of DIAP1 triggers a novel Drosophila cell death pathway mediated by Dark and DRONC.** *J Biol Chem* 2002, **277**(26):23103-23106.
48. Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartweg E, Steller H: **Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function.** *EMBO J* 2000, **19**(4):589-597.
49. Wang SL, Hawkins CJ, Yoo SJ, Muller HA, Hay BA: **The Drosophila caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID.** *Cell* 1999, **98**(4):453-463.
50. Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H: **Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(6):432-438.
51. Bergmann A: **The role of ubiquitylation for the control of cell death in Drosophila.** *Cell Death Differ* 2010, **17**(1):61-67.
52. Ditzel M, Wilson R, Tenev T, Zachariou A, Paul A, Deas E, Meier P: **Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2003, **5**(5):467-473.
53. Ditzel M, Broemer M, Tenev T, Bolduc C, Lee TV, Rigbolt KT, Elliott R, Zvelebil M, Blagoev B, Bergmann A *et al*: **Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation.** *Mol Cell* 2008, **32**(4):540-553.
54. Chai J, Yan N, Huh JR, Wu JW, Li W, Hay BA, Shi Y: **Molecular mechanism of Reaper-Grim-Hid-mediated suppression of DIAP1-dependent Dronc ubiquitination.** *Nat Struct Biol* 2003, **10**(11):892-898.
55. Lee TV, Fan Y, Wang S, Srivastava M, Broemer M, Meier P, Bergmann A: **Drosophila IAP1-mediated ubiquitylation controls activation of the initiator**

- caspase DRONC independent of protein degradation.** *PLoS Genet* 2011, **7**(9):e1002261.
56. Broemer M, Tenev T, Rigbolt KT, Hempel S, Blagoev B, Silke J, Ditzel M, Meier P: **Systematic in vivo RNAi analysis identifies IAPs as NEDD8-E3 ligases.** *Mol Cell* 2010, **40**(5):810-822.
  57. Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, Steller H, Meier P: **The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(6):445-450.
  58. Olson MR, Holley CL, Yoo SJ, Huh JR, Hay BA, Kornbluth S: **Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination.** *J Biol Chem* 2003, **278**(6):4028-4034.
  59. Holley CL, Olson MR, Colon-Ramos DA, Kornbluth S: **Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(6):439-444.
  60. Yan N, Wu JW, Chai J, Li W, Shi Y: **Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid and Grim.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**(5):420-428.
  61. Li X, Wang J, Shi Y: **Structural mechanisms of DIAP1 auto-inhibition and DIAP1-mediated inhibition of drICE.** *Nat Commun* 2011, **2**:408.
  62. Leulier F, Ribeiro PS, Palmer E, Tenev T, Takahashi K, Robertson D, Zachariou A, Pichaud F, Ueda R, Meier P: **Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the Drosophila cell death machinery.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(10):1663-1674.
  63. Reuveny A, Elhanany H, Volk T: **Enhanced sensitivity of midline glial cells to apoptosis is achieved by HOW(L)-dependent repression of Diap1.** *Mech Dev* 2009, **126**(1-2):30-41.
  64. Lee EW, Seo J, Jeong M, Lee S, Song J: **The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis.** *BMB Rep* 2012, **45**(9):496-508.
  65. Fadeel B, Orrenius S: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease.** *J Intern Med* 2005, **258**(6):479-517.
  66. Lavrik IN, Krammer PH: **Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(1):36-41.
  67. Varfolomeev EE, Ashkenazi A: **Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?** *Cell* 2004, **116**(4):491-497.
  68. Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, Kanuka H, Kuranaga E, Aigaki T, Miura M: **Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway.** *EMBO J* 2002, **21**(12):3009-3018.
  69. Kanda H, Igaki T, Kanuka H, Yagi T, Miura M: **Wengen, a member of the Drosophila tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling.** *J Biol Chem* 2002, **277**(32):28372-28375.
  70. Moreno E, Yan M, Basler K: **Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily.** *Curr Biol* 2002, **12**(14):1263-1268.
  71. Xue L, Igaki T, Kuranaga E, Kanda H, Miura M, Xu T: **Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in Drosophila.** *Dev Cell* 2007, **13**(3):446-454.
  72. Kauppila S, Maaty WS, Chen P, Tomar RS, Eby MT, Chapo J, Chew S, Rathore N, Zachariah S, Sinha SK *et al*: **Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila.** *Oncogene* 2003, **22**(31):4860-4867.

73. Keller LC, Cheng L, Locke CJ, Muller M, Fetter RD, Davis GW: **Glial-derived prodegenerative signaling in the Drosophila neuromuscular system.** *Neuron* 2011, **72**(5):760-775.
74. Ma X, Huang J, Yang L, Yang Y, Li W, Xue L: **NOPO modulates Egr-induced JNK-independent cell death in Drosophila.** *Cell Res* 2012, **22**(2):425-431.
75. Kanda H, Igaki T, Okano H, Miura M: **Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(47):18977-18982.
76. Chang L, Karin M: **Mammalian MAP kinase signalling cascades.** *Nature* 2001, **410**(6824):37-40.
77. Jasper H, Benes V, Schwager C, Sauer S, Clauder-Munster S, Ansorge W, Bohmann D: **The genomic response of the Drosophila embryo to JNK signaling.** *Dev Cell* 2001, **1**(4):579-586.
78. Martin-Blanco E: **Regulation of cell differentiation by the Drosophila Jun kinase cascade.** *Curr Opin Genet Dev* 1997, **7**(5):666-671.
79. Srivastava A, Pastor-Pareja JC, Igaki T, Pagliarini R, Xu T: **Basement membrane remodeling is essential for Drosophila disc eversion and tumor invasion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(8):2721-2726.
80. Bosch M, Serras F, Martin-Blanco E, Baguna J: **JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating Drosophila wing imaginal discs.** *Dev Biol* 2005, **280**(1):73-86.
81. Biteau B, Karpac J, Hwangbo D, Jasper H: **Regulation of Drosophila lifespan by JNK signaling.** *Exp Gerontol* 2011, **46**(5):349-354.
82. Bidla G, Dushay MS, Theopold U: **Crystal cell rupture after injury in Drosophila requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 7):1209-1215.
83. Uhlirova M, Bohmann D: **JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in Drosophila.** *EMBO J* 2006, **25**(22):5294-5304.
84. Igaki T: **Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signaling.** *Apoptosis* 2009, **14**(8):1021-1028.
85. Geuking P, Narasimamurthy R, Basler K: **A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of Drosophila TAB2 as a functionally conserved component.** *Genetics* 2005, **171**(4):1683-1694.
86. Stronach B: **Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time.** *Dev Dyn* 2005, **232**(3):575-584.
87. Liu H, Su YC, Becker E, Treisman J, Skolnik EY: **A Drosophila TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**(2):101-104.
88. Ma X, Yang L, Yang Y, Li M, Li W, Xue L: **dUev1a modulates TNF-JNK mediated tumor progression and cell death in Drosophila.** *Dev Biol* 2013, **380**(2):211-221.
89. Igaki T, Pastor-Pareja JC, Aonuma H, Miura M, Xu T: **Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in Drosophila.** *Dev Cell* 2009, **16**(3):458-465.
90. Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, Miura M: **Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9):705-710.

91. Shlevkov E, Morata G: **A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(3):451-460.
92. Yang CS, Thomenius MJ, Gan EC, Tang W, Freel CD, Merritt TJ, Nutt LK, Kornbluth S: **Metabolic regulation of Drosophila apoptosis through inhibitory phosphorylation of Dronc.** *EMBO J* 2010, **29**(18):3196-3207.
93. Fagone P, Jackowski S: **Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function.** *J Lipid Res* 2009, **50** Suppl:S311-316.
94. Lipskaia L, Hulot JS, Lompre AM: **Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation.** *Pflugers Arch* 2009, **457**(3):673-685.
95. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E *et al*: **Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration.** *Int Rev Cell Mol Biol* 2013, **301**:215-290.
96. Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L: **Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps.** *Cell Calcium* 2002, **32**(5-6):279-305.
97. Coe H, Michalak M: **Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum.** *Gen Physiol Biophys* 2009, **28** Spec No Focus:F96-F103.
98. Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J: **The Ca<sup>2+</sup> pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**(5).
99. Choe CU, Ehrlich BE: **The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork.** *Sci STKE* 2006, **2006**(363):re15.
100. Taylor CW, Tovey SC: **IP(3) receptors: toward understanding their activation.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(12):a004010.
101. Irvine RF: **'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism.** *FEBS Lett* 1990, **263**(1):5-9.
102. Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K: **Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44.** *Cell* 2005, **120**(1):85-98.
103. Van Petegem F: **Ryanodine receptors: structure and function.** *J Biol Chem* 2012, **287**(38):31624-31632.
104. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K *et al*: **Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.** *Nature* 1995, **375**(6534):754-760.
105. Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS: **Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues.** *J Neurosci* 1996, **16**(23):7513-7525.
106. De Strooper B, Annaert W: **Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010, **26**:235-260.
107. Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P: **Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue.** *Neuroreport* 1997, **8**(4):1025-1029.



108. Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y *et al*: **Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**(8):479-485.
109. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM *et al*: **Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells.** *Nat Med* 1996, **2**(2):224-229.
110. Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-Hyslop PS, Cordell B, Fraser P, De Strooper B: **Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons.** *J Cell Biol* 1999, **147**(2):277-294.
111. Laudon H, Hansson EM, Melen K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G, Naslund J: **A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1.** *J Biol Chem* 2005, **280**(42):35352-35360.
112. Dries DR, Yu G: **Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease.** *Curr Alzheimer Res* 2008, **5**(2):132-146.
113. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M *et al*: **Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo.** *Neuron* 1996, **17**(1):181-190.
114. Steiner H, Romig H, Pesold B, Philipp U, Baader M, Citron M, Loetscher H, Jacobsen H, Haass C: **Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis.** *Biochemistry* 1999, **38**(44):14600-14605.
115. Bergmans BA, De Strooper B: **gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies.** *Lancet Neurol* 2010, **9**(2):215-226.
116. Fukumori A, Fluhner R, Steiner H, Haass C: **Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis.** *J Neurosci* 2010, **30**(23):7853-7862.
117. Brunkan AL, Martinez M, Walker ES, Goate AM: **Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage.** *Mol Cell Neurosci* 2005, **29**(1):65-73.
118. Zhang J, Kang DE, Xia W, Okochi M, Mori H, Selkoe DJ, Koo EH: **Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**(20):12436-12442.
119. Stempfle D, Kanwar R, Loewer A, Fortini ME, Merdes G: **In vivo reconstitution of gamma-secretase in Drosophila results in substrate specificity.** *Mol Cell Biol* 2010, **30**(13):3165-3175.
120. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ: **Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity.** *Nature* 1999, **398**(6727):513-517.
121. Mao G, Cui MZ, Li T, Jin Y, Xu X: **Pen-2 is dispensable for endoproteolysis of presenilin 1, and nicastrin-Aph subcomplex is important for both gamma-secretase assembly and substrate recruitment.** *J Neurochem* 2012, **123**(5):837-844.
122. Hu Y, Fortini ME: **Different cofactor activities in gamma-secretase assembly: evidence for a nicastrin-Aph-1 subcomplex.** *J Cell Biol* 2003, **161**(4):685-690.
123. Prokop S, Shirotani K, Edbauer D, Haass C, Steiner H: **Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex.** *J Biol Chem* 2004, **279**(22):23255-23261.

124. Zhang S, Zhang M, Cai F, Song W: **Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis.** *Transl Neurodegener* 2013, **2**(1):15.
125. Jin H, Sanjo N, Uchihara T, Watabe K, St George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: **Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress.** *J Alzheimers Dis* 2010, **20**(1):261-273.
126. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ: **Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(11):6382-6387.
127. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I: **Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations.** *Cell* 2006, **126**(5):981-993.
128. Zhang H, Sun S, Herreman A, De Strooper B, Bezprozvanny I: **Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis.** *J Neurosci* 2010, **30**(25):8566-8580.
129. Nelson O, Supnet C, Liu H, Bezprozvanny I: **Familial Alzheimer's disease mutations in presenilins: effects on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and correlation with clinical phenotypes.** *J Alzheimers Dis* 2010, **21**(3):781-793.
130. Leissring MA, Parker I, LaFerla FM: **Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals.** *J Biol Chem* 1999, **274**(46):32535-32538.
131. Yoo AS, Cheng I, Chung S, Grenfell TZ, Lee H, Pack-Chung E, Handler M, Shen J, Xia W, Tesco G *et al*: **Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry.** *Neuron* 2000, **27**(3):561-572.
132. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL: **Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(2):534-538.
133. Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, Pham DG, Xie J, Robinson N, Martin GM, Mattson MP: **Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide.** *Neuroreport* 1996, **8**(1):379-383.
134. Akbari Y, Hitt BD, Murphy MP, Dagher NN, Tseng BP, Green KN, Golde TE, LaFerla FM: **Presenilin regulates capacitative calcium entry dependently and independently of gamma-secretase activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**(4):1145-1152.
135. Honarnejad K, Jung CK, Lammich S, Arzberger T, Kretschmar H, Herms J: **Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease.** *J Cell Mol Med* 2013, **17**(2):293-302.
136. Nelson O, Supnet C, Tolia A, Horre K, De Strooper B, Bezprozvanny I: **Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore.** *J Biol Chem* 2011, **286**(25):22339-22347.
137. Shilling D, Mak DO, Kang DE, Foskett JK: **Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak channels.** *J Biol Chem* 2012, **287**(14):10933-10944.
138. Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I, LaFerla FM: **SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production.** *J Cell Biol* 2008, **181**(7):1107-1116.

139. Rybalchenko V, Hwang SY, Rybalchenko N, Koulen P: **The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(1):84-97.
140. Hayrapetyan V, Rybalchenko V, Rybalchenko N, Koulen P: **The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction.** *Cell Calcium* 2008, **44**(5):507-518.
141. Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP: **Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons.** *J Biol Chem* 2000, **275**(24):18195-18200.
142. Cheung KH, Shineman D, Muller M, Cardenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM, Foscett JK: **Mechanism of Ca<sup>2+</sup> disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP<sub>3</sub> receptor channel gating.** *Neuron* 2008, **58**(6):871-883.
143. Cheung KH, Mei L, Mak DO, Hayashi I, Iwatsubo T, Kang DE, Foscett JK: **Gain-of-function enhancement of IP<sub>3</sub> receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons.** *Sci Signal* 2010, **3**(114):ra22.
144. Corsi AK, Schekman R: **Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 1996, **271**(48):30299-30302.
145. Dobson CM: **Principles of protein folding, misfolding and aggregation.** *Semin Cell Dev Biol* 2004, **15**(1):3-16.
146. Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH: **The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ .** *Physiol Rev* 2011, **91**(4):1219-1243.
147. Rutkevich LA, Williams DB: **Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum.** *Curr Opin Cell Biol* 2011, **23**(2):157-166.
148. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M: **Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum.** *Biochem J* 2009, **417**(3):651-666.
149. Corbett EF, Michalak M: **Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum?** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**(7):307-311.
150. Williams DB: **Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 4):615-623.
151. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H: **ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats.** *Genes Dev* 2002, **16**(11):1345-1355.
152. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K *et al*: **Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.** *Nat Genet* 2000, **25**(3):302-305.
153. Schroder M, Kaufman RJ: **ER stress and the unfolded protein response.** *Mutat Res* 2005, **569**(1-2):29-63.
154. Sood R, Porter AC, Ma K, Quilliam LA, Wek RC: **Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$  kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress.** *Biochem J* 2000, **346** Pt 2:281-293.

155. Cox JS, Walter P: **A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response.** *Cell* 1996, **87**(3):391-404.
156. Plongthongkum N, Kullawong N, Panyim S, Tirasophon W: **Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in *Drosophila melanogaster*.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **354**(3):789-794.
157. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ: **The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response.** *Genes Dev* 2000, **14**(21):2725-2736.
158. Papa FR, Zhang C, Shokat K, Walter P: **Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug.** *Science* 2003, **302**(5650):1533-1537.
159. Aragon T, van Anken E, Pincus D, Serafimova IM, Korennykh AV, Rubio CA, Walter P: **Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites.** *Nature* 2009, **457**(7230):736-740.
160. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ: **IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response.** *Genes Dev* 2002, **16**(4):452-466.
161. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K: **ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(18):6755-6767.
162. Benosman S, Ravanan P, Correa RG, Hou YC, Yu M, Gulen MF, Li X, Thomas J, Cuddy M, Matsuzawa Y *et al*: **Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-2 (IRAK2) Is a Critical Mediator of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e64256.
163. Hollien J, Weissman JS: **Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response.** *Science* 2006, **313**(5783):104-107.
164. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS: **Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells.** *J Cell Biol* 2009, **186**(3):323-331.
165. Gaddam D, Stevens N, Hollien J: **Comparison of mRNA localization and regulation during endoplasmic reticulum stress in *Drosophila* cells.** *Mol Biol Cell* 2013, **24**(1):14-20.
166. Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K: **Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(2):158-164.
167. Yanagitani K, Imagawa Y, Iwawaki T, Hosoda A, Saito M, Kimata Y, Kohno K: **Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA.** *Mol Cell* 2009, **34**(2):191-200.
168. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K: **pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response.** *J Cell Biol* 2006, **172**(4):565-575.
169. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ: **Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis.** *Mol Cell* 2001, **7**(6):1165-1176.

170. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D: **Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response.** *Mol Cell* 2000, **5**(5):897-904.
171. Kozak M: **Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation.** *Gene* 2002, **299**(1-2):1-34.
172. Fernandez J, Bode B, Koromilas A, Diehl JA, Krukovets I, Snider MD, Hatzoglou M: **Translation mediated by the internal ribosome entry site of the cat-1 mRNA is regulated by glucose availability in a PERK kinase-dependent manner.** *J Biol Chem* 2002, **277**(14):11780-11787.
173. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R *et al*: **An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress.** *Mol Cell* 2003, **11**(3):619-633.
174. Cullinan SB, Diehl JA: **PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress.** *J Biol Chem* 2004, **279**(19):20108-20117.
175. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC: **Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(3):1365-1377.
176. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S: **Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(4):1292-1303.
177. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D: **Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression.** *EMBO J* 2003, **22**(5):1180-1187.
178. Pomar N, Berlanga JJ, Campuzano S, Hernandez G, Elias M, de Haro C: **Functional characterization of Drosophila melanogaster PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase.** *Eur J Biochem* 2003, **270**(2):293-306.
179. Mounir Z, Krishnamoorthy JL, Wang S, Papadopoulou B, Campbell S, Muller WJ, Hatzoglou M, Koromilas AE: **Akt determines cell fate through inhibition of the PERK-eIF2alpha phosphorylation pathway.** *Sci Signal* 2011, **4**(192):ra62.
180. Hewes RS, Schaefer AM, Taghert PH: **The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in Drosophila.** *Genetics* 2000, **155**(4):1711-1723.
181. Bernales S, Papa FR, Walter P: **Intracellular signaling by the unfolded protein response.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:487-508.
182. Ryoo HD, Steller H: **Unfolded protein response in Drosophila: why another model can make it fly.** *Cell Cycle* 2007, **6**(7):830-835.
183. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH: **XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(21):7448-7459.
184. Chen X, Shen J, Prywes R: **The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi.** *J Biol Chem* 2002, **277**(15):13045-13052.
185. Schindler AJ, Schekman R: **In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(42):17775-17780.

186. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K: **Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.** *Mol Biol Cell* 1999, **10**(11):3787-3799.
187. Holcik M, Sonenberg N: **Translational control in stress and apoptosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(4):318-327.
188. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R: **ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals.** *Dev Cell* 2002, **3**(1):99-111.
189. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K: **Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 9):1681-1688.
190. Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Ito T, Hirata A, Suzuki T, Oikawa D, Takeuchi M, Kohno K: **Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins.** *J Cell Biol* 2007, **179**(1):75-86.
191. Oikawa D, Kitamura A, Kinjo M, Iwawaki T: **Direct association of unfolded proteins with mammalian ER stress sensor, IRE1beta.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e51290.
192. Pincus D, Chevalier MW, Aragon T, van Anken E, Vidal SE, El-Samad H, Walter P: **BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response.** *PLoS Biol* 2010, **8**(7):e1000415.
193. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K, Iwawaki T: **Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins.** *Exp Cell Res* 2009, **315**(15):2496-2504.
194. Kimata Y, Kohno K: **Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells.** *Curr Opin Cell Biol* 2011, **23**(2):135-142.
195. Ma K, Vattem KM, Wek RC: **Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress.** *J Biol Chem* 2002, **277**(21):18728-18735.
196. Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M, Lee AS: **Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response.** *J Biol Chem* 2004, **279**(12):11354-11363.
197. Nakanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K: **Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(3):1027-1043.
198. Roy B, Lee AS: **The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(6):1437-1443.
199. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K: **XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor.** *Cell* 2001, **107**(7):881-891.
200. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K: **Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response.** *Biochem J* 2002, **366**(Pt 2):585-594.
201. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K: **A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.** *Dev Cell* 2003, **4**(2):265-271.

202. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P: **Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.** *Cell* 2000, **101**(3):249-258.
203. Ma Y, Hendershot LM: **Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways.** *J Biol Chem* 2004, **279**(14):13792-13799.
204. Casas-Tinto S, Zhang Y, Sanchez-Garcia J, Gomez-Velazquez M, Rincon-Limas DE, Fernandez-Funez P: **The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity.** *Hum Mol Genet* 2011, **20**(11):2144-2160.
205. Hamanaka RB, Bobrovnikova-Marjon E, Ji X, Liebhaber SA, Diehl JA: **PERK-dependent regulation of IAP translation during ER stress.** *Oncogene* 2009, **28**(6):910-920.
206. Rojas-Rivera D, Armisen R, Colombo A, Martinez G, Eguiguren AL, Diaz A, Kiviluoto S, Rodriguez D, Patron M, Rizzuto R *et al*: **TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis.** *Cell Death Differ* 2012, **19**(6):1013-1026.
207. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D: **CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum.** *Genes Dev* 1998, **12**(7):982-995.
208. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ: **Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(4):1249-1259.
209. Jiang C, Zhang S, Liu H, Zeng Q, Xia T, Chen Y, Kuang G, Zhao G, Wu X, Zhang X *et al*: **The role of the IRE1 pathway in PBDE-47-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells in vitro.** *Toxicol Lett* 2012, **211**(3):325-333.
210. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D: **Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.** *Mol Cell* 2000, **6**(5):1099-1108.
211. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ: **Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins.** *PLoS Biol* 2006, **4**(11):e374.
212. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM: **Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response.** *J Mol Biol* 2002, **318**(5):1351-1365.
213. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N *et al*: **ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim.** *Cell* 2007, **129**(7):1337-1349.
214. Tabas I, Ron D: **Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress.** *Nat Cell Biol* 2011, **13**(3):184-190.
215. Lai E, Teodoro T, Volchuk A: **Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response.** *Physiology (Bethesda)* 2007, **22**:193-201.
216. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D: **CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.** *Genes Dev* 2004, **18**(24):3066-3077.

217. Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I: **Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.** *J Cell Biol* 2009, **186**(6):783-792.
218. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, Backs T, Bassel-Duby R, Olson EN, Anderson ME *et al*: **Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways.** *J Clin Invest* 2009, **119**(10):2925-2941.
219. Seimon TA, Obstfeld A, Moore KJ, Golenbock DT, Tabas I: **Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(52):19794-19799.
220. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D: **Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.** *Science* 2000, **287**(5453):664-666.
221. Kang MJ, Ryoo HD: **Suppression of retinal degeneration in Drosophila by stimulation of ER-associated degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(40):17043-17048.
222. Shieh BH: **Molecular genetics of retinal degeneration: A Drosophila perspective.** *Fly (Austin)* 2011, **5**(4):356-368.
223. Kang MJ, Chung J, Ryoo HD: **CDK5 and MEKK1 mediate pro-apoptotic signalling following endoplasmic reticulum stress in an autosomal dominant retinitis pigmentosa model.** *Nat Cell Biol* 2012, **14**(4):409-415.
224. Rasheva VI, Domingos PM: **Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis.** *Apoptosis* 2009, **14**(8):996-1007.
225. Bryant PJ, Simpson P: **Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs.** *Q Rev Biol* 1984, **59**(4):387-415.
226. Edgar BA, Lehner CF: **Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective.** *Science* 1996, **274**(5293):1646-1652.
227. Sigrist S, Jacobs H, Stratmann R, Lehner CF: **Exit from mitosis is regulated by Drosophila fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3.** *EMBO J* 1995, **14**(19):4827-4838.
228. Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA: **Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing.** *Cell* 1998, **93**(7):1183-1193.
229. Herranz H, Perez L, Martin FA, Milan M: **A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the Drosophila wing.** *EMBO J* 2008, **27**(11):1633-1645.
230. Duman-Scheel M, Johnston LA, Du W: **Repression of dMyc expression by Wingless promotes Rbf-induced G1 arrest in the presumptive Drosophila wing margin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(11):3857-3862.
231. Herranz H, Hong X, Perez L, Ferreira A, Olivieri D, Cohen SM, Milan M: **The miRNA machinery targets Mei-P26 and regulates Myc protein levels in the Drosophila wing.** *EMBO J* 2010, **29**(10):1688-1698.
232. Lecuit T, Le Goff L: **Orchestrating size and shape during morphogenesis.** *Nature* 2007, **450**(7167):189-192.
233. Dubois I: **Morphogènes et endocytose.** *Médecine et science* 2003, **19**(3):p. 351-357351-357357.



234. Baker NE: **Transcription of the segment-polarity gene wingless in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal wg mutation.** *Development* 1988, **102**(3):489-497.
235. Zecca M, Basler K, Struhl G: **Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing.** *Development* 1995, **121**(8):2265-2278.
236. Neumann CJ, Cohen SM: **Distinct mitogenic and cell fate specification functions of wingless in different regions of the wing.** *Development* 1996, **122**(6):1781-1789.
237. Affolter M, Basler K: **The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**(9):663-674.
238. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A *et al*: **Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF.** *Cell* 1997, **88**(6):789-799.
239. Zecca M, Basler K, Struhl G: **Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient.** *Cell* 1996, **87**(5):833-844.
240. Wartlick O, Mumcu P, Kicheva A, Bittig T, Seum C, Julicher F, Gonzalez-Gaitan M: **Dynamics of Dpp signaling and proliferation control.** *Science* 2011, **331**(6021):1154-1159.
241. Rogulja D, Irvine KD: **Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient.** *Cell* 2005, **123**(3):449-461.
242. Schwank G, Yang SF, Restrepo S, Basler K: **Comment on "Dynamics of dpp signaling and proliferation control".** *Science* 2012, **335**(6067):401; author reply 401.
243. Schwank G, Restrepo S, Basler K: **Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels.** *Development* 2008, **135**(24):4003-4013.
244. Martin FA, Perez-Garijo A, Moreno E, Morata G: **The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*.** *Development* 2004, **131**(20):4921-4930.
245. Campbell G, Tomlinson A: **Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by brinker.** *Cell* 1999, **96**(4):553-562.
246. Oh H, Irvine KD: **Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam.** *Dev Cell* 2011, **20**(1):109-122.
247. Doumpas N, Ruiz-Romero M, Blanco E, Edgar B, Corominas M, Teleman AA: **Brk regulates wing disc growth in part via repression of Myc expression.** *EMBO Rep* 2013, **14**(3):261-268.
248. Deb DK, Tanaka-Matakatsu M, Jones L, Richardson HE, Du W: **Wingless signaling directly regulates cyclin E expression in proliferating embryonic PNS precursor cells.** *Mech Dev* 2008, **125**(9-10):857-864.
249. Zecca M, Struhl G: **Recruitment of cells into the *Drosophila* wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation.** *Development* 2007, **134**(16):3001-3010.
250. Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB: **Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene.** *Nature* 1996, **382**(6587):133-138.

251. Baena-Lopez LA, Garcia-Bellido A: **Control of growth and positional information by the graded vestigial expression pattern in the wing of *Drosophila melanogaster*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(37):13734-13739.
252. Delanoue R, Legent K, Godefroy N, Flagiello D, Dutriaux A, Vaudin P, Becker JL, Silber J: **The *Drosophila* wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc.** *Cell Death Differ* 2004, **11**(1):110-122.
253. Simon MA, Xu A, Ishikawa HO, Irvine KD: **Modulation of fat:dachsous binding by the cadherin domain kinase four-jointed.** *Curr Biol* 2010, **20**(9):811-817.
254. Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng WM, Pan D: **Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded.** *Dev Cell* 2010, **18**(2):288-299.
255. Deng Y, Matsui Y, Zhang Y, Lai ZC: **Hippo activation through homodimerization and membrane association for growth inhibition and organ size control.** *Dev Biol* 2013, **375**(2):152-159.
256. Reddy BV, Irvine KD: **The Fat and Warts signaling pathways: new insights into their regulation, mechanism and conservation.** *Development* 2008, **135**(17):2827-2838.
257. Halder G, Johnson RL: **Hippo signaling: growth control and beyond.** *Development* 2011, **138**(1):9-22.
258. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL: **The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal.** *Nat Cell Biol* 2011, **13**(8):877-883.
259. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL: **The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version.** *Genes Dev* 2010, **24**(9):862-874.
260. Srivastava A, MacKay JO, Bell JB: **A Vestigial:Scalloped TEA domain chimera rescues the wing phenotype of a scalloped mutation in *Drosophila melanogaster*.** *Genesis* 2002, **33**(1):40-47.
261. Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A: **SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*.** *Curr Biol* 2008, **18**(6):435-441.
262. Liu X, Grammont M, Irvine KD: **Roles for scalloped and vestigial in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge.** *Dev Biol* 2000, **228**(2):287-303.
263. Rogulja D, Rauskolb C, Irvine KD: **Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway.** *Dev Cell* 2008, **15**(2):309-321.
264. Mao Y, Rauskolb C, Cho E, Hu WL, Hayter H, Minihan G, Katz FN, Irvine KD: **Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in *Drosophila*.** *Development* 2006, **133**(13):2539-2551.
265. Schwank G, Tauriello G, Yagi R, Kranz E, Koumoutsakos P, Basler K: **Antagonistic growth regulation by Dpp and Fat drives uniform cell proliferation.** *Dev Cell* 2011, **20**(1):123-130.
266. Pan D: **The hippo signaling pathway in development and cancer.** *Dev Cell* 2010, **19**(4):491-505.
267. Zecca M, Struhl G: **A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth.** *PLoS Biol* 2010, **8**(6):e1000386.

268. Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB: **Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research.** *Annu Rev Entomol* 2013, **58**:497-516.
269. Thummel CS: **Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*.** *Dev Cell* 2001, **1**(4):453-465.
270. Shingleton AW: **The regulation of organ size in *Drosophila*: physiology, plasticity, patterning and physical force.** *Organogenesis* 2010, **6**(2):76-87.
271. Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT: **Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:883-916.
272. Riddiford LM: **Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis.** *Receptor* 1993, **3**(3):203-209.
273. Callier V, Nijhout HF: **Body size determination in insects: a review and synthesis of size- and brain-dependent and independent mechanisms.** *Biol Rev Camb Philos Soc* 2013.
274. Bateman JM, McNeill H: **Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in *Drosophila*.** *Cell* 2004, **119**(1):87-96.
275. Blundell TL, Humbel RE: **Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors.** *Nature* 1980, **287**(5785):781-787.
276. Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E: **An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control.** *Curr Biol* 2001, **11**(4):213-221.
277. Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R: **Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes.** *Science* 2002, **296**(5570):1118-1120.
278. Rajan A, Perrimon N: ***Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion.** *Cell* 2012, **151**(1):123-137.
279. Geminard C, Rulifson EJ, Leopold P: **Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*.** *Cell Metab* 2009, **10**(3):199-207.
280. Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carre C, Noselli S, Leopold P: **Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*.** *Science* 2005, **310**(5748):667-670.
281. Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M: **Ras activity in the *Drosophila* prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release.** *Curr Biol* 2005, **15**(20):1785-1795.
282. Gibbens YY, Warren JT, Gilbert LI, O'Connor MB: **Neuroendocrine regulation of *Drosophila* metamorphosis requires TGFbeta/Activin signaling.** *Development* 2011, **138**(13):2693-2703.
283. Layalle S, Arquier N, Leopold P: **The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*.** *Dev Cell* 2008, **15**(4):568-577.
284. Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF: **Critical weight in the development of insect body size.** *Evol Dev* 2003, **5**(2):188-197.
285. Noguti T, Adachi-Yamada T, Katagiri T, Kawakami A, Iwami M, Ishibashi J, Kataoka H, Suzuki A, Go M, Ishizaki H: **Insect prothoracicotropic hormone: a new member of the vertebrate growth factor superfamily.** *FEBS Lett* 1995, **376**(3):251-256.

286. Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB: **The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis.** *Science* 2009, **326**(5958):1403-1405.
287. Rybczynski R, Bell SC, Gilbert LI: **Activation of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) by the insect prothoracicotropic hormone.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **184**(1-2):1-11.
288. McBrayer Z, Ono H, Shimell M, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O'Connor MB: **Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*.** *Dev Cell* 2007, **13**(6):857-871.
289. Andersen DS, Colombani J, Leopold P: **Coordination of organ growth: principles and outstanding questions from the world of insects.** *Trends Cell Biol* 2013, **23**(7):336-344.
290. Rewitz KF, Yamanaka N, O'Connor MB: **Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation.** *Curr Top Dev Biol* 2013, **103**:1-33.
291. Li TR, White KP: **Tissue-specific gene expression and ecdysone-regulated genomic networks in *Drosophila*.** *Dev Cell* 2003, **5**(1):59-72.
292. Ninov N, Manjon C, Martin-Blanco E: **Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, EGFR, and PI3K signaling in *Drosophila* histoblasts.** *PLoS Biol* 2009, **7**(4):e1000079.
293. Cranna N, Quinn L: **Impact of steroid hormone signals on *Drosophila* cell cycle during development.** *Cell Div* 2009, **4**:3.
294. Mitchell N, Cranna N, Richardson H, Quinn L: **The Ecdysone-inducible zinc-finger transcription factor Crol regulates Wg transcription and cell cycle progression in *Drosophila*.** *Development* 2008, **135**(16):2707-2716.
295. Gerenday A, Fallon AM: **Ecdysone-induced accumulation of mosquito cells in the G1 phase of the cell cycle.** *J Insect Physiol* 2004, **50**(9):831-838.
296. Besson MT, Cordier G, Quennedey B, Quennedey A, Delachambre J: **Variability of ecdysteroid-induced cell cycle alterations in *Drosophila* Kc sublines.** *Cell Tissue Kinet* 1987, **20**(4):413-425.
297. Siaussat D, Bozzolan F, Queguiner I, Porcheron P, Debernard S: **Cell cycle profiles of EcR, USP, HR3 and B cyclin mRNAs associated to 20E-induced G2 arrest of *Plodia interpunctella* imaginal wing cells.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**(2):151-161.
298. Siaussat D, Bozzolan F, Porcheron P, Debernard S: **The 20-hydroxyecdysone-induced signalling pathway in G2/M arrest of *Plodia interpunctella* imaginal wing cells.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(5):529-539.
299. Bement WM, Forscher P, Mooseker MS: **A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance.** *J Cell Biol* 1993, **121**(3):565-578.
300. Williams-Masson EM, Malik AN, Hardin J: **An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis.** *Development* 1997, **124**(15):2889-2901.
301. Brock J, Midwinter K, Lewis J, Martin P: **Healing of incisional wounds in the embryonic chick wing bud: characterization of the actin purse-string and demonstration of a requirement for Rho activation.** *J Cell Biol* 1996, **135**(4):1097-1107.

302. Jacinto A, Wood W, Balayo T, Turmaine M, Martinez-Arias A, Martin P: **Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during Drosophila dorsal closure.** *Curr Biol* 2000, **10**(22):1420-1426.
303. Jacinto A, Wood W, Woolner S, Hiley C, Turner L, Wilson C, Martinez-Arias A, Martin P: **Dynamic analysis of actin cable function during Drosophila dorsal closure.** *Curr Biol* 2002, **12**(14):1245-1250.
304. Agnes F, Noselli S: **[Dorsal closure in Drosophila. A genetic model for wound healing?].** *C R Acad Sci III* 1999, **322**(1):5-13.
305. Martin P, Parkhurst SM: **Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis.** *Development* 2004, **131**(13):3021-3034.
306. Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, Martin P: **Wound healing recapitulates morphogenesis in Drosophila embryos.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(11):907-912.
307. Kwon YC, Baek SH, Lee H, Choe KM: **Nonmuscle myosin II localization is regulated by JNK during Drosophila larval wound healing.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **393**(4):656-661.
308. Jacinto A, Woolner S, Martin P: **Dynamic analysis of dorsal closure in Drosophila: from genetics to cell biology.** *Dev Cell* 2002, **3**(1):9-19.
309. Redd MJ, Cooper L, Wood W, Stramer B, Martin P: **Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**(1445):777-784.
310. Galko MJ, Krasnow MA: **Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae.** *PLoS Biol* 2004, **2**(8):E239.
311. Ramet M, Lanot R, Zachary D, Manfruelli P: **JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in Drosophila.** *Dev Biol* 2002, **241**(1):145-156.
312. Mattila J, Omelyanchuk L, Kytala S, Turunen H, Nokkala S: **Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a Drosophila melanogaster wing imaginal disc.** *Int J Dev Biol* 2005, **49**(4):391-399.
313. Glise B, Bourbon H, Noselli S: **hemipterous encodes a novel Drosophila MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement.** *Cell* 1995, **83**(3):451-461.
314. Stronach B, Perrimon N: **Activation of the JNK pathway during dorsal closure in Drosophila requires the mixed lineage kinase, slipper.** *Genes Dev* 2002, **16**(3):377-387.
315. Garlena RA, Gonda RL, Green AB, Pileggi RM, Stronach B: **Regulation of mixed-lineage kinase activation in JNK-dependent morphogenesis.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 18):3177-3188.
316. Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM, Martinez-Arias A: **puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila.** *Genes Dev* 1998, **12**(4):557-570.
317. Baek SH, Kwon YC, Lee H, Choe KM: **Rho-family small GTPases are required for cell polarization and directional sensing in Drosophila wound healing.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **394**(3):488-492.
318. Baek SH, Cho HW, Kwon YC, Lee JH, Kim MJ, Lee H, Choe KM: **Requirement for Pak3 in Rac1-induced organization of actin and myosin during Drosophila larval wound healing.** *FEBS Lett* 2012, **586**(6):772-777.

319. Glise B, Noselli S: **Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in Drosophila morphogenesis.** *Genes Dev* 1997, **11**(13):1738-1747.
320. Stevens LJ, Page-McCaw A: **A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing.** *Mol Biol Cell* 2012, **23**(6):1068-1079.
321. Glasheen BM, Kabra AT, Page-McCaw A: **Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a Drosophila matrix metalloproteinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(8):2659-2664.
322. Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR *et al*: **RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells.** *Mol Cell* 2009, **35**(4):511-522.
323. Brock AR, Wang Y, Berger S, Renkawitz-Pohl R, Han VC, Wu Y, Galko MJ: **Transcriptional regulation of Profilin during wound closure in Drosophila larvae.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 23):5667-5676.
324. Belacortu Y, Paricio N: **Drosophila as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates.** *Dev Dyn* 2011, **240**(11):2379-2404.
325. Bryant PJ: **Pattern formation in the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster: fate map, regeneration and duplication.** *J Exp Zool* 1975, **193**(1):49-77.
326. Bryant PJ, Adler PN, Duranceau C, Fain MJ, Glenn S, Hsei B, James AA, Littlefield CL, Reinhardt CA, Strub S *et al*: **Regulative interactions between cells from different imaginal disks of Drosophila melanogaster.** *Science* 1978, **201**(4359):928-930.
327. Bosch M, Baguna J, Serras F: **Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of Drosophila wing imaginal discs.** *Int J Dev Biol* 2008, **52**(8):1043-1050.
328. McClure KD, Schubiger G: **A screen for genes that function in leg disc regeneration in Drosophila melanogaster.** *Mech Dev* 2008, **125**(1-2):67-80.
329. Bryant PJ, O'Brochta DA: **Growth patterns in Drosophila imaginal discs.** *Prog Clin Biol Res* 1986, **217A**:297-300.
330. Dale L, Bownes M: **Wound Healing and Regeneration in the Imaginal Wing Disc of Drosophila** *Developmental Biology* 1981, **190**:185-190.
331. Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Marti M, Dubova I, Izpisua Belmonte JC: **Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration.** *Genes Dev* 2006, **20**(23):3232-3237.
332. Schubiger M, Sustar A, Schubiger G: **Regeneration and transdetermination: the role of wingless and its regulation.** *Dev Biol* 2010, **347**(2):315-324.
333. Sustar A, Bonvin M, Schubiger M, Schubiger G: **Drosophila twin spot clones reveal cell division dynamics in regenerating imaginal discs.** *Dev Biol* 2011, **356**(2):576-587.
334. Klebes A, Sustar A, Kechris K, Li H, Schubiger G, Kornberg TB: **Regulation of cellular plasticity in Drosophila imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes.** *Development* 2005, **132**(16):3753-3765.
335. Schubiger G: **Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of Drosophila melanogaster.** *Dev Biol* 1971, **26**(2):277-295.

336. Milan M, Campuzano S, Garcia-Bellido A: **Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(11):5691-5696.
337. Haynie JL, Bryant PJ: **The effects of X-rays on the proliferation dynamics of Cells in the imagina wing disc of *Drosophila melanogaster*.** *Roux's Arch* 1977, **183**:85-100.
338. Yu SY, Yoo SJ, Yang L, Zapata C, Srinivasan A, Hay BA, Baker NE: **A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye.** *Development* 2002, **129**(13):3269-3278.
339. Ryoo HD, Gorenc T, Steller H: **Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways.** *Dev Cell* 2004, **7**(4):491-501.
340. Perez-Garijo A, Martin FA, Morata G: **Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*.** *Development* 2004, **131**(22):5591-5598.
341. Perez-Garijo A, Martin FA, Struhl G, Morata G: **Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(49):17664-17669.
342. McEwen DG, Peifer M: **Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis.** *Development* 2005, **132**(17):3935-3946.
343. Wells BS, Yoshida E, Johnston LA: **Compensatory proliferation in *Drosophila* imaginal discs requires Dronc-dependent p53 activity.** *Curr Biol* 2006, **16**(16):1606-1615.
344. Huh JR, Guo M, Hay BA: **Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role.** *Curr Biol* 2004, **14**(14):1262-1266.
345. Kondo S, Senoo-Matsuda N, Hiromi Y, Miura M: **DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(19):7258-7268.
346. Fan Y, Bergmann A: **Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye.** *Dev Cell* 2008, **14**(3):399-410.
347. Martin FA, Perez-Garijo A, Morata G: **Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells.** *Int J Dev Biol* 2009, **53**(8-10):1341-1347.
348. Perez-Garijo A, Shlevkov E, Morata G: **The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc.** *Development* 2009, **136**(7):1169-1177.
349. Smith-Bolton RK, Worley MI, Kanda H, Hariharan IK: **Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc.** *Dev Cell* 2009, **16**(6):797-809.
350. Sun G, Irvine KD: **Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors.** *Dev Biol* 2011, **350**(1):139-151.
351. Herrera SC, Martin R, Morata G: **Tissue homeostasis in the wing disc of *Drosophila melanogaster*: immediate response to massive damage during development.** *PLoS Genet* 2013, **9**(4):e1003446.
352. Bergantinos C, Corominas M, Serras F: **Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling.** *Development* 2010, **137**(7):1169-1179.

353. Sun G, Irvine KD: **Ajuba Family Proteins Link JNK to Hippo Signaling.** *Sci Signal* 2013, **6**(292):ra81.
354. Mollereau B, Perez-Garijo A, Bergmann A, Miura M, Gerlitz O, Ryoo HD, Steller H, Morata G: **Compensatory proliferation and apoptosis-induced proliferation: a need for clarification.** *Cell Death Differ* 2013, **20**(1):181.
355. Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W, Martinou JC, Galliot B: **Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration.** *Dev Cell* 2009, **17**(2):279-289.
356. Reiter S, Crescenzi M, Galliot B, Buzgariu W: **Hydra, a versatile model to study the homeostatic and developmental functions of cell death.** *Int J Dev Biol* 2012, **56**(6-8):593-604.
357. Galliot B: **Injury-induced asymmetric cell death as a driving force for head regeneration in Hydra.** *Dev Genes Evol* 2013, **223**(1-2):39-52.
358. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY: **Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration.** *Sci Signal* 2010, **3**(110):ra13.
359. Mesquita D, Dekanty A, Milan M: **A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in Drosophila.** *PLoS Biol* 2010, **8**(12):e1000566.
360. Sustar A, Schubiger G: **A transient cell cycle shift in Drosophila imaginal disc cells precedes multipotency.** *Cell* 2005, **120**(3):383-393.
361. Mirth CK, Shingleton AW: **Integrating body and organ size in Drosophila: recent advances and outstanding problems.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012, **3**:49.
362. Stieper BC, Kupershtok M, Driscoll MV, Shingleton AW: **Imaginal discs regulate developmental timing in Drosophila melanogaster.** *Dev Biol* 2008, **321**(1):18-26.
363. Simpson P, Berreur P, Berreur-Bonnenfant J: **The initiation of pupariation in Drosophila: dependence on growth of the imaginal discs.** *J Embryol Exp Morphol* 1980, **57**:155-165.
364. Russell MA: **Pattern formation in the imaginal discs of a temperature-sensitive cell-lethal mutant of Drosophila melanogaster.** *Dev Biol* 1974, **40**(1):24-39.
365. Hussey RG, Thompson WR, Calhoun ET: **The Influence of X-Rays on the Development of Drosophila Larvae.** *Science* 1927, **66**(1698):65-66.
366. Poodry CA: **shibire, a neurogenic mutant of Drosophila.** *Dev Biol* 1990, **138**(2):464-472.
367. Bourgin RC, Krumins R, Quastler H: **Radiation-induced delay of pupation in Drosophila.** *Radiat Res* 1956, **5**(6):657-673.
368. Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M: **Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation.** *Science* 2012, **336**(6081):579-582.
369. Halme A, Cheng M, Hariharan IK: **Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in Drosophila.** *Curr Biol* 2010, **20**(5):458-463.
370. Wells BS, Johnston LA: **Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in Drosophila by p53.** *Dev Biol* 2012, **361**(2):263-276.
371. Hackney JF, Zolali-Meybodi O, Cherbas P: **Tissue damage disrupts developmental progression and ecdysteroid biosynthesis in Drosophila.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e49105.



372. P.Simpson, H.A.Schneiderman, . **Isolation of temperature sensitive mutations blocking clone development in *Drosophila melanogaster*, and the effects of a temperature sensitive cell lethal mutation on pattern formation in imaginal discs.** *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* 1975, **178**(247-275).
373. Parker NF, Shingleton AW: **The coordination of growth among *Drosophila* organs in response to localized growth-perturbation.** *Dev Biol* 2011, **357**(2):318-325.
374. Gronke S, Clarke DF, Broughton S, Andrews TD, Partridge L: **Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides.** *PLoS Genet* 2010, **6**(2):e1000857.
375. Colombani J, Andersen DS, Leopold P: **Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing.** *Science* 2012, **336**(6081):582-585.
376. Dewes: **Regeneration in transplanted halves of male genital disks and its influence upon duration of development in *Ephesia kühniella* Z. .** *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 1973, **172**:349-354.
377. Maden M, Hind M: **Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule.** *Dev Dyn* 2003, **226**(2):237-244.
378. Hind M, Maden M: **Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung.** *Eur Respir J* 2004, **23**(1):20-27.
379. Hariharan IK, Bilder D: **Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*.** *Annu Rev Genet* 2006, **40**:335-361.
380. Parker J: **Control of compartment size by an EGF ligand from neighboring cells.** *Curr Biol* 2006, **16**(20):2058-2065.
381. Asano M, Nevins JR, Wharton RP: **Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs.** *Genes Dev* 1996, **10**(11):1422-1432.
382. Brumby AM, Richardson HE: **scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*.** *EMBO J* 2003, **22**(21):5769-5779.
383. Adachi-Yamada T, Fujimura-Kamada K, Nishida Y, Matsumoto K: **Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing.** *Nature* 1999, **400**(6740):166-169.
384. Allemand I, Grimber G, Kornprobst M, Bennoun M, Molina T, Briand P, Joulin V: **Compensatory apoptosis in response to SV40 large T antigen expression in the liver.** *Oncogene* 1995, **11**(12):2583-2590.
385. Koike K, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S: **Compensatory apoptosis in preneoplastic liver of a transgenic mouse model for viral hepatocarcinogenesis.** *Cancer Lett* 1998, **134**(2):181-186.
386. Nicholson SC, Gilbert MM, Nicolay BN, Frolov MV, Moberg KH: **The archipelago tumor suppressor gene limits rb/e2f-regulated apoptosis in developing *Drosophila* tissues.** *Curr Biol* 2009, **19**(18):1503-1510.
387. Urban S, Brown G, Freeman M: **EGF receptor signalling protects smooth-cuticle cells from apoptosis during *Drosophila* ventral epidermis development.** *Development* 2004, **131**(8):1835-1845.
388. Bergmann A, Agapite J, McCall K, Steller H: **The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling.** *Cell* 1998, **95**(3):331-341.

389. Demay Y, Perrochon J, Szuplewski S, Contamine D, Gaumer S: **The PERK/ATF4 branch of the Unfolded Pathway Response regulates a Dilp8-dependent developmental delay favoring tissue regeneration through the Rac1/Slpr/JNK pathway in *Drosophila melanogaster*.** *soumis* 2013.
390. de Celis JF, Garcia-Bellido A: **Roles of the Notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis.** *Mech Dev* 1994, **46**(2):109-122.
391. de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ: **Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc.** *Development* 1996, **122**(1):359-369.
392. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S: **Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice.** *Cell* 1997, **89**(4):629-639.
393. Micchelli CA, Esler WP, Kimberly WT, Jack C, Berezovska O, Kornilova A, Hyman BT, Perrimon N, Wolfe MS: **Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*.** *FASEB J* 2003, **17**(1):79-81.
394. Souid S, Lepesant JA, Yanicostas C: **The xbp-1 gene is essential for development in *Drosophila*.** *Dev Genes Evol* 2007, **217**(2):159-167.
395. Jurisch-Yaksi N, Rose AJ, Lu H, Raemaekers T, Munck S, Baatsen P, Baert V, Vermeire W, Scales SJ, Verleyen D *et al*: **Rer1p maintains ciliary length and signaling by regulating gamma-secretase activity and Foxj1a levels.** *J Cell Biol* 2013, **200**(6):709-720.
396. Lukinova NI, Roussakova VV, Fortini ME: **Genetic characterization of cytological region 77A-D harboring the presenilin gene of *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 1999, **153**(4):1789-1797.
397. Coulthard AB, Alm C, Cealiac I, Sinclair DA, Honda BM, Rossi F, Dimitri P, Hilliker AJ: **Essential loci in centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. I: the right arm of chromosome 2.** *Genetics* 2010, **185**(2):479-495.
398. Tien AC, Rajan A, Schulze KL, Ryoo HD, Acar M, Steller H, Bellen HJ: **Ero1L, a thiol oxidase, is required for Notch signaling through cysteine bridge formation of the Lin12-Notch repeats in *Drosophila melanogaster*.** *J Cell Biol* 2008, **182**(6):1113-1125.
399. Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I: **NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis.** *J Cell Biol* 2010, **191**(6):1113-1125.
400. Popugaeva E, Bezprozvanny I: **Role of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease.** *Front Mol Neurosci* 2013, **6**:29.
401. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR: **Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation.** *Science* 2001, **292**(5521):1552-1555.
402. Kouroku Y, Fujita E, Jimbo A, Kikuchi T, Yamagata T, Momoi MY, Kominami E, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S *et al*: **Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**(13):1505-1515.
403. Velentzas PD, Velentzas AD, Mpakou VE, Antonelou MH, Margaritis LH, Papassideri IS, Stravopodis DJ: **Detrimental effects of proteasome inhibition activity in *Drosophila melanogaster*: implication of ER stress, autophagy, and apoptosis.** *Cell Biol Toxicol* 2013, **29**(1):13-37.

404. Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Scheper W: **Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease.** *Neurodegener Dis* 2012, **10**(1-4):212-215.
405. Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, Rusten TE, Stenmark H, Brech A: **Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain.** *J Cell Biol* 2008, **180**(6):1065-1071.
406. Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, Sanchez H, Kotzebue RW, Cumming RC, Harris GL, Nezis IP, Schubert DR, Simonsen A *et al*: **p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects.** *Autophagy* 2011, **7**(6):572-583.
407. Elefant F, Palter KB: **Tissue-specific expression of dominant negative mutant *Drosophila* HSC70 causes developmental defects and lethality.** *Mol Biol Cell* 1999, **10**(7):2101-2117.
408. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A: **The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(16):7683-7699.
409. Marchal C, Vinatier G, Sanial M, Plessis A, Pret AM, Limbourg-Bouchon B, Theodore L, Netter S: **The HIV-1 Vpu protein induces apoptosis in *Drosophila* via activation of JNK signaling.** *PLoS One* 2012, **7**(3):e34310.
410. Luo X, Puig O, Hyun J, Bohmann D, Jasper H: **Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation.** *EMBO J* 2007, **26**(2):380-390.
411. Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM: ***Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus.** *Cell* 2000, **101**(1):103-113.
412. Fan Y, Lee TV, Xu D, Chen Z, Lamblin AF, Steller H, Bergmann A: **Dual roles of *Drosophila* p53 in cell death and cell differentiation.** *Cell Death Differ* 2010, **17**(6):912-921.
413. Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang L, Wang SL, Feldman RM, Clem RJ, Muller HA, Hay BA: **Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(6):416-424.
414. Peterson C, Carney GE, Taylor BJ, White K: **reaper is required for neuroblast apoptosis during *Drosophila* development.** *Development* 2002, **129**(6):1467-1476.
415. White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H: **Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*.** *Science* 1994, **264**(5159):677-683.
416. Lisi S, Mazzon I, White K: **Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*.** *Genetics* 2000, **154**(2):669-678.
417. Malzer E, Daly ML, Moloney A, Sendall TJ, Thomas SE, Ryder E, Ryoo HD, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ: **Impaired tissue growth is mediated by checkpoint kinase 1 (CHK1) in the integrated stress response.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 17):2892-2900.
418. Martin FA, Morata G: **Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc.** *Development* 2006, **133**(22):4421-4426.

419. Yamaguchi M, Nishimoto Y, Hirose F, Matsukage A: **Distribution of PCNA during postblastoderm cell division cycles in the *Drosophila melanogaster* embryo: effect of a string- mutation.** *Cell Struct Funct* 1995, **20**(1):47-57.
420. Johnston LA, Edgar BA: **Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing.** *Nature* 1998, **394**(6688):82-84.
421. Roos WP, Kaina B: **DNA damage-induced cell death by apoptosis.** *Trends Mol Med* 2006, **12**(9):440-450.
422. Capdevila J, Estrada MP, Sanchez-Herrero E, Guerrero I: **The *Drosophila* segment polarity gene patched interacts with decapentaplegic in wing development.** *EMBO J* 1994, **13**(1):71-82.
423. Martin-Castellanos C, Edgar BA: **A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing.** *Development* 2002, **129**(4):1003-1013.
424. Kyriakis JM: **Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses.** *Biochem Soc Symp* 1999, **64**:29-48.
425. Stronach BE, Perrimon N: **Stress signaling in *Drosophila*.** *Oncogene* 1999, **18**(45):6172-6182.
426. Biggs WH, 3rd, Zavitz KH, Dickson B, van der Straten A, Brunner D, Hafen E, Zipursky SL: **The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway.** *EMBO J* 1994, **13**(7):1628-1635.
427. Inoue H, Tateno M, Fujimura-Kamada K, Takaesu G, Adachi-Yamada T, Ninomiya-Tsuji J, Irie K, Nishida Y, Matsumoto K: **A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK.** *EMBO J* 2001, **20**(19):5421-5430.
428. Zhang L, Ren F, Zhang Q, Chen Y, Wang B, Jiang J: **The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control.** *Dev Cell* 2008, **14**(3):377-387.
429. Legent K, Dutriaux A, Delanoue R, Silber J: **Cell cycle genes regulate vestigial and scalloped to ensure normal proliferation in the wing disc of *Drosophila melanogaster*.** *Genes Cells* 2006, **11**(8):907-918.
430. Paumard-Rigal S, Zider A, Vaudin P, Silber J: **Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*.** *Dev Genes Evol* 1998, **208**(8):440-446.
431. Su YC, Treisman JE, Skolnik EY: **The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway.** *Genes Dev* 1998, **12**(15):2371-2380.
432. Siderovski DP, Willard FS: **The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits.** *Int J Biol Sci* 2005, **1**(2):51-66.
433. Greenberg L, Hatini V: **Systematic expression and loss-of-function analysis defines spatially restricted requirements for *Drosophila* RhoGEFs and RhoGAPs in leg morphogenesis.** *Mech Dev* 2011, **128**(1-2):5-17.
434. Geisbrecht ER, Haralalka S, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM: ***Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization.** *Dev Biol* 2008, **314**(1):137-149.

435. Charrasse S, Comunale F, Fortier M, Portales-Casamar E, Debant A, Gauthier-Rouviere C: **M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(5):1734-1743.
436. Hornstein I, Mortin MA, Katzav S: **DroVav, the Drosophila melanogaster homologue of the mammalian Vav proteins, serves as a signal transducer protein in the Rac and DER pathways.** *Oncogene* 2003, **22**(43):6774-6784.
437. Brumby AM, Goulding KR, Schlosser T, Loi S, Galea R, Khoo P, Bolden JE, Aigaki T, Humbert PO, Richardson HE: **Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in Drosophila melanogaster: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis.** *Genetics* 2011, **188**(1):105-125.
438. Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y, Hoshino M: **The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration.** *EMBO J* 2003, **22**(16):4190-4201.
439. Struhl G, Greenwald I: **Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila.** *Nature* 1999, **398**(6727):522-525.
440. Ye Y, Lukinova N, Fortini ME: **Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants.** *Nature* 1999, **398**(6727):525-529.
441. Struhl G, Greenwald I: **Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in Drosophila.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(1):229-234.
442. Cooper E, Deng WM, Chung HM: **Aph-1 is required to regulate Presenilin-mediated gamma-secretase activity and cell survival in Drosophila wing development.** *Genesis* 2009, **47**(3):169-174.
443. Michno K, Knight D, Campusano JM, van de Hoef D, Boulianne GL: **Intracellular calcium deficits in Drosophila cholinergic neurons expressing wild type or FAD-mutant presenilin.** *PLoS One* 2009, **4**(9):e6904.
444. Fouillet A, Levet C, Virgone A, Robin M, Dourlen P, Rieusset J, Belaidi E, Ovize M, Touret M, Nataf S *et al*: **ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy.** *Autophagy* 2012, **8**(6):915-926.
445. Nir R, Grossman R, Paroush Z, Volk T: **Phosphorylation of the Drosophila melanogaster RNA-binding protein HOW by MAPK/ERK enhances its dimerization and activity.** *PLoS Genet* 2012, **8**(3):e1002632.
446. Jolly C, Lakhota SC: **Human sat III and Drosophila hsr omega transcripts: a common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(19):5508-5514.
447. Prasanth KV, Rajendra TK, Lal AK, Lakhota SC: **Omega speckles - a novel class of nuclear speckles containing hnRNPs associated with noncoding hsr-omega RNA in Drosophila.** *J Cell Sci* 2000, **113 Pt 19**:3485-3497.
448. Mallik M, Lakhota SC: **The developmentally active and stress-inducible noncoding hsromega gene is a novel regulator of apoptosis in Drosophila.** *Genetics* 2009, **183**(3):831-852.
449. Mallik M, Lakhota SC: **RNAi for the large non-coding hsromega transcripts suppresses polyglutamine pathogenesis in Drosophila models.** *RNA Biol* 2009, **6**(4):464-478.
450. Kuranaga E, Miura M: **Genetic approaches for the identification of apoptotic components.** *Med Mol Morphol* 2005, **38**(1):18-22.

451. Grusche FA, Degoutin JL, Richardson HE, Harvey KF: **The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*.** *Dev Biol* 2011, **350**(2):255-266.
452. Hufnagel L, Teleman AA, Rouault H, Cohen SM, Shraiman BI: **On the mechanism of wing size determination in fly development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(10):3835-3840.
453. Aegerter-Wilmsen T, Aegerter CM, Hafen E, Basler K: **Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*.** *Mech Dev* 2007, **124**(4):318-326.
454. Shraiman BI: **Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(9):3318-3323.
455. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L *et al*: **Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**(5):466-472.
456. Debat V, Bloyer S, Faradji F, Gidaszewski N, Navarro N, Orozco-Terwengel P, Ribeiro V, Schlotterer C, Deutsch JS, Peronnet F: **Developmental stability: a major role for cyclin G in *drosophila melanogaster*.** *PLoS Genet* 2011, **7**(10):e1002314.
457. Bakal C, Linding R, Llense F, Heffern E, Martin-Blanco E, Pawson T, Perrimon N: **Phosphorylation networks regulating JNK activity in diverse genetic backgrounds.** *Science* 2008, **322**(5900):453-456.
458. Ye Y, Fortini ME: **Characterization of *Drosophila* Presenilin and its colocalization with Notch during development.** *Mech Dev* 1998, **79**(1-2):199-211.
459. Netter S, Faucheux M, Theodore L: **Developmental dynamics of a polyhomeotic-EGFP fusion in vivo.** *DNA Cell Biol* 2001, **20**(8):483-492.
460. Go MJ, Eastman DS, Artavanis-Tsakonas S: **Cell proliferation control by Notch signaling in *Drosophila* development.** *Development* 1998, **125**(11):2031-2040.
461. Srivastava A, Simmonds AJ, Garg A, Fossheim L, Campbell SD, Bell JB: **Molecular and functional analysis of scalloped recessive lethal alleles in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 2004, **166**(4):1833-1843.
462. Hay BA, Huh JR, Guo M: **The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(12):911-922.
463. Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Matsumoto K: **p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):2322-2329.
464. Ring JM, Martinez Arias A: **puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva.** *Dev Suppl* 1993:251-259.
465. Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D: **The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway.** *Dev Cell* 2008, **14**(3):388-398.
466. Simmonds AJ, Brook WJ, Cohen SM, Bell JB: **Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing.** *Nature* 1995, **376**(6539):424-427.